

Neue Pflanzenzuchtverfahren

Aktualisierung des Grundlagenberichts aus dem Jahr 2012

Im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt (BAFU)

Januar 2016

Impressum

Auftraggeber: Bundesamt für Umwelt (BAFU), Abt. Boden und Biotechnologie, CH-3003 Bern
Das BAFU ist ein Amt des Eidg. Departements für Umwelt, Verkehr, Energie und Kommunikation (UVEK).

Auftragnehmer: Baudirektion des Kantons Zürich, Amt für Abfall, Wasser, Energie und Luft (AWEL),
Sektion Biosicherheit (SBS)

Autor: Benno Vogel, AWEL, SBS.

Begleitung AWEL: Christina Stadler, SBS

Begleitung BAFU: Khaoula Belhaj Fragnière, Sektion Biotechnologie

Hinweis: Dieser Bericht wurde im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt (BAFU) verfasst. Für den Inhalt ist allein der Auftragnehmer verantwortlich.

Zusammenfassung

In den letzten Jahren sind mehrere neue Pflanzenzuchtverfahren (NPZV) entwickelt worden, bei denen zu klären ist, wie sie und die aus ihnen gewonnenen Produkte rechtlich zu regulieren sind. Um den aus den NPZV entstehenden Handlungsbedarf evaluieren zu können, hat das Bundesamt für Umwelt (BAFU) im Jahr 2012 von der Sektion Biosicherheit (SBS) des Amtes für Abfall, Wasser, Energie und Luft (AWEL) einen Grundlagenbericht erstellen lassen. Der vorliegende Bericht aktualisiert diesen Grundlagenbericht teilweise. Er behandelt 22 NPZV und beschreibt jeweils die Technik, die möglichen Anwendungen sowie den Stand der Entwicklung.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Cisgenese	1
2.1 Beschreibung des Verfahrens.....	1
2.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht.....	4
2.3 Stand der Entwicklung.....	4
3. Intragenese	4
3.1 Beschreibung des Verfahrens.....	5
3.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht.....	7
3.3 Stand der Entwicklung.....	7
4. Pfropfen mit gentechnisch veränderten Wurzelstöcken	7
4.1 Beschreibung des Verfahrens.....	8
4.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht.....	8
4.3 Stand der Entwicklung.....	9
5. TraitUp-Verfahren	9
5.1 Beschreibung des Verfahrens.....	9
5.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht.....	10
5.3 Stand der Entwicklung.....	10
6. NRE-Technik	10
6.1 Beschreibung des Verfahrens.....	10
6.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht.....	14
6.3 Stand der Entwicklung.....	14
7. Oligonukleotid-dirigierte Mutagenese (ODM)	15
7.1 Beschreibung des Verfahrens.....	15
7.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht.....	17
7.3 Stand der Entwicklung.....	17
8. T-DNA-vermittelte Mutagenese	17
8.1 Beschreibung des Verfahrens.....	17
8.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht.....	18
8.3 Stand der Entwicklung.....	18
9. RNAi-induzierte CMS	18
9.1 Beschreibung des Verfahrens.....	18
9.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht.....	18
9.3 Stand der Entwicklung.....	18
10. Transgen-gesteuerte Mutagenese	19
10.1 Beschreibung des Verfahrens.....	19
10.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht.....	19
10.3 Stand der Entwicklung.....	19
11. Developmental Reprogramming	19
11.1 Beschreibung des Verfahrens.....	19
11.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht.....	20
11.3 Stand der Entwicklung.....	20
12. RNAi-induzierte Hypomethylierung	20
12.1 Beschreibung des Verfahrens.....	20
12.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht.....	20

12.3 Stand der Entwicklung	20
13. RNA-dirigierte DNA-Methylierung (RdDM)	21
13.1 Beschreibung des Verfahrens	21
13.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht	21
13.3 Stand der Entwicklung	21
14. Agroinfiltration.....	22
14.1 Beschreibung des Verfahrens	22
14.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht	23
14.3 Stand der Entwicklung	23
15. Blühverfrühungs-Technik	24
15.1 Beschreibung des Verfahrens	24
15.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht	25
15.3 Stand der Entwicklung	26
16. Markergen-unterstützte Haploidenzüchtung	26
16.1 Beschreibung des Verfahrens	26
16.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht	27
16.3 Stand der Entwicklung	27
17. Markergen-unterstützte Kreuzungszüchtung	27
17.1 Beschreibung des Verfahrens	27
17.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht	27
17.3 Stand der Entwicklung	27
18. Reverse Breeding (RB)	28
18.1 Beschreibung des Verfahrens	28
18.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht	Fehler! Textmarke nicht definiert.
18.3 Stand der Entwicklung	29
19. Seed Production Technology.....	29
19.1 Beschreibung des Verfahrens	29
19.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht	30
19.3 Stand der Entwicklung	30
20. Zentromer-vermittelte Genomelimination.....	30
20.1 Beschreibung des Verfahrens	31
20.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht	31
20.3 Stand der Entwicklung	31
21. Virus-induziertes Gen-Silencing (VIGS)	31
21.1 Beschreibung des Verfahrens	32
21.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht	33
21.3 Stand der Entwicklung	33
22. Virus-unterstützte Genexpression	33
23. Transformation mit Wildtyp Agrobacterium rhizogenes	34
24. Konzepte für neue Pflanzenzuchtverfahren	34
24.1 Epigenetische Editierung	34
24.2 Transgen-basierte rekurrente Selektion	34
24.3 Gezielte chemische Mutagenese	35
Referenzen	35

1. Einleitung

Mit den Fortschritten in der Molekularbiologie und Biotechnologie sind in den letzten Jahren mehrere neue Pflanzenzuchtverfahren (NPZV) entwickelt worden, die eines gemeinsam haben: Sie basieren zwar auf dem Einsatz gentechnischer Methoden, können aber zu Produkten führen, die frei von artfremden Genen sind. Einige dieser NPZV kommen bereits in Züchtungsprogrammen des kommerziellen Sektors zum Einsatz und in Nordamerika sind erste NPZV-Sorten auf dem Markt. In den kommenden Jahren ist weltweit mit der Lancierung weiterer NPZV-Produkte zu rechnen.

Da es mit der Entwicklung der NPZV zunehmend schwieriger wird, eine klare Trennlinie zwischen gentechnischen und herkömmlichen Züchtungsverfahren zu ziehen, herrscht eine Unsicherheit darüber, ob die aus den NPZV hervorgehenden Pflanzen rechtlich GVO sind oder nicht. Diese Unsicherheit hat international eine Debatte darüber ausgelöst, wie NPZV-Produkte rechtlich zu regulieren und die Governanz der NPZV zu gestalten ist.

Wie die NPZV und daraus resultierende Produkte in der Schweiz zu regulieren sind, ist gegenwärtig unklar. Um die bestehende Rechtsunsicherheit anzugehen, hat das Bundesamt für Umwelt (BAFU) als federführendes Amt des Gentechnikgesetzes (GTG) im Jahr 2012 bei der Sektion Biosicherheit (SBS) des Amtes für Abfall, Wasser, Energie und Luft (AWEL) einen Grundlagenbericht über die NPZV erstellen lassen (Vogel 2012). Dieser Bericht behandelt die damals bekannten NPZV und stellt die Fragen dar, die sich im Zusammenhang mit den beschriebenen NPZV auf rechtlicher oder regulatorischer Ebene stellen.

Der vorliegende Bericht ist eine teilweise Aktualisierung des Grundlagenberichts aus dem Jahr 2012. Er behandelt 22 NPZV und beschreibt dazu jeweils die Technik, die möglichen Anwendungen sowie den aktuellen Stand der Entwicklung. Mit der CRISPR/Cas9-Technik (behandelt bei der NRE-Technik in Abschnitt 6), der RNAi-induzierten CMS, der Transgen-gesteuerten Mutagenese, der Markergen-unterstützten Kreuzungs- und Haploidenzüchtung, dem TraitUp-Verfahren sowie dem *Developmental Reprogramming* beschreibt er sieben NPZV, die im Grundlagenbericht aus dem Jahr 2012 nicht behandelt worden sind.

2. Cisgenese

Die Cisgenese ist ein Konzept für die Transformation von Pflanzen. Im Gegensatz zur Transgenese, bei der Gene zwischen x-beliebigen Arten ausgetauscht werden, beinhaltet das Konzept der Cisgenese, dass Pflanzen nur mit arteigenen Genen oder mit Genen von nah verwandten, sexuell kompatiblen Arten transformiert werden (Holme et al. 2013, Lusser et al. 2012, Vanblaere et al. 2011). Die transformierten Gene liegen dabei in ihrer natürlichen Orientierung vor, besitzen ihre eigenen Introns und sind von ihren nativen Promotoren und Terminatoren flankiert (Holme et al. 2013, Molesini et al. 2012, Lusser et al. 2011, Vanblaere et al. 2011, Prins & Kok 2010, Schaart & Visser 2009, Schouten et al. 2006a/b). In Tabelle 1 sind die wesentlichen Unterscheidungsmerkmale zwischen der Transgenese und der Cisgenese dargestellt.

2.1 Beschreibung des Verfahrens

Bei der Cisgenese wird das Erbgut von Pflanzen mit einem oder mehreren Cisgenen transformiert. Cisgene sind Gene aus dem natürlichen Genpool der zu transformierenden Pflanze, das heisst, sie stammen entweder von der Art selbst oder von einer verwandten, kreuzungskompatiblen Art. Cisgene werden aus einer Pflanzenzelle isoliert und dann unverändert in das Erbgut einer anderen

Pflanzenzelle eingefügt. Deshalb liegen sie in *sense*-Orientierung vor, besitzen ihre Introns und sind von ihren Promotoren und Terminatoren flankiert (Abbildung 1).

Cisgene werden mit den gleichen Gentransfermethoden in das Erbgut eingefügt, die bei der Herstellung gentechnisch veränderter Pflanzen üblicherweise verwendet werden, wobei der Transfer der Cisgene gegenwärtig hauptsächlich mit Hilfe von Agrobakterien erfolgt. Auch die NRE-Techniken (Abschnitt 6) können zur Herstellung cisgener Pflanzen eingesetzt werden.

Tabelle 1: Transgenese und Cisgenese – zwei unterschiedliche Strategien zur Transformation von Pflanzen (nach Molesini et al. 2012).

	Transgenese	Cisgenese
Quelle der kodierenden DNA-Sequenzen	Alle Arten	Dieselbe Art oder kreuzungskompatible Art
Quelle der regulatorischen DNA-Sequenzen	Alle Arten	Dieselbe Art oder kreuzungskompatible Art
Typ des genetischen Konstrukts	Neue Kombinationen von kodierenden und regulatorischen Sequenzen	Perfekte Kopie des natürlichen Gens
Orientierung der exprimierten Sequenz	<i>Sense</i> - oder <i>antisense</i> -Orientierung, Haarnadel-Konstrukte	<i>Sense</i> -Orientierung
T-DNA Grenzsequenzen	Linke und rechte Grenzsequenzen der <i>Agrobacterium</i> -T-DNA	keine spezifischen Anforderungen
Selektierbare Markergene	Marker vorhanden	Keine oder cisgene Marker vorhanden

Da cisgene Pflanzen per Definition keine artfremden Gene enthalten sollen, muss ihre Herstellung so erfolgen, dass sie entweder einen cisgenen Marker besitzen (Rosellini 2011) oder frei von Markergenen sind. Für die Herstellung Marker-freier cisgener Pflanzen stehen unterschiedliche Strategien zur Verfügung, wobei es möglich ist, Markergene aus transformierten Pflanzen zu entfernen oder Pflanzen direkt ohne Markergene zu transformieren (Breyer et al. 2014).

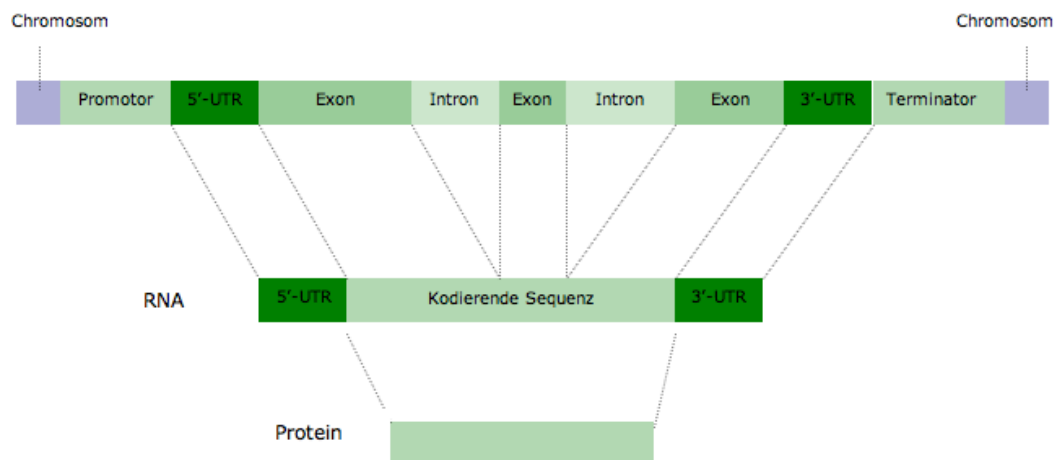


Abbildung 1: Struktur eines typischen Pflanzengens. Das Gen ist Teil eines Chromosoms und besteht aus Promotor und Terminator, 5'- und 3'-nicht translatierten Regionen (UTR) sowie Exons und Introns. Promotor und Terminator sind regulatorische Sequenzen. Die Exons können bei der Transkription fusioniert und dann in ein Protein translatiert werden. Abbildung nach Schaart & Visser (2009).

2.1.1 Definitive Aspekte

Die Cisgenese ist ein Konzept, das in der Literatur unterschiedlich definiert wird (Holme et al. 2013, Prins & Kok 2010). Unabhängig von den jeweiligen Definitionen gibt es einige Aspekte, die es gegenwärtig weitgehend verhindern, auf eine «hieb- und stichfeste» Art und Weise festzulegen, was Cisgenese ist (Prins & Kok 2010). Die Aspekte, die bei der Definition der Cisgenese zu einer «grauen Zone» (Prins & Kok 2010) führen könnten, sind im Folgenden aufgeführt.

Zeitpunkt der Definition: Unklar ist gegenwärtig, an welchem Punkt des Prozesses die Definition angewandt werden soll. Bezieht sich die Definition auf die beabsichtigte genetische Veränderung oder nur auf die Veränderung, die tatsächlich in der Pflanze stattgefunden hat (Prins & Kok 2010).

Codonveränderungen: Ist die Sequenz eines Cisgens bekannt, so ist es grundsätzlich möglich, das Cisgen synthetisch herzustellen und dabei die Sequenz an die Codonvorlieben der zu transformierenden Pflanze anzupassen. Inwiefern synthetische Gene mit optimierten Codons unter die Definition der Cisgenese fallen oder nicht, ist unklar (Prins & Kok 2010).

Insertion partieller Cisgene: Bei der Transformation von Pflanzen mit Cisgenen ist es möglich, dass es neben der Insertion ganzer Cisgene auch zur Insertion von Bruchstücken und zu Rearrangements kommt. Ob Pflanzen mit solchen Bruchstücken und/oder Rearrangements als cisgen gelten können, ist unklar (Prins & Kok 2010).

Quelle der Cisgene: Was die Quelle der Cisgene betrifft, werden bei den unterschiedlichen Definitionen der Cisgenese verschiedene Begriffe verwendet: Cisgene können aus dem «natürlichen Genpool» einer Pflanze stammen oder aus dem «Genpool der Züchter» (*breeder's gene pool*) oder von «kreuzbaren Arten» oder von «sexuell kompatiblen Arten». Zu klären sein könnten dabei folgende Fragen: Können Gene, die sich allein via eine Brückenkreuzung in eine Pflanze einkreuzen lassen, als Cisgene eingesetzt werden? Können Gene, die sich allein via Weite Kreuzungen und *embryo-rescue*-Verfahren in eine Pflanze übertragen lassen, als Cisgene verwendet werden? Hängt die Antwort auf die beiden Fragen davon ab, ob die Gene bereits via Brückenkreuzung oder Weite Kreuzung übertragen worden sind und somit im Erbgut einer «direkt» kreuzbaren Art vorliegen?

Transfer von Organellen-Genen: Zusätzlich zum Erbgut des Zellkerns besitzen Pflanzen auch die Organellen-Genome der Plastiden und Mitochondrien. Gene aus den Organellen-Genomen lassen sich mit den etablierten Transformationstechniken ebenfalls transferieren. Inwiefern und in welchen Fällen solche Gene als Cisgene definiert werden könnten, bleibt zu diskutieren (Prins & Kok 2010). EFSA (2012) betrachtet den Transfer von Organellen-Genen zwischen sexuell kompatiblen Pflanzenarten dann als Cisgenese, wenn die Gene in das gleiche Organell integriert werden, aus dem sie stammen.

Insertion «überflüssiger» Sequenzen: Mit den gängigen Transformationsmethoden können zusammen mit den Cisgenen auch noch weitere Sequenzen ins Erbgut einer Pflanze inseriert werden. Zu diesen Sequenzen können folgende gehören: Vektor-Rückgrat-Sequenzen (Gelvin 2003), Sequenzen aus dem chromosomalen Erbgut von Agrobakterien (Ulker et al. 2008), Grenzsequenzen der T-DNA (Holme et al. 2012), synthetische Sequenzen (z.B. multiple Klonierungsstellen, die sich innerhalb der T-DNA befinden; Holme et al. 2012) sowie Erkennungssequenzen von Rekombinasen, die bei bestimmten Methoden zur Entfernung von Markergenen im Erbgut der Pflanze zurückbleiben können (beim *Cre/loxP*-Rekombinationssystem beispielsweise bleibt eine einzelne *loxP*-Sequenz zurück; Terada et al. 2010). In den Fällen, in denen überflüssige Sequenzen nicht mit dem Cisgen verlinkt sind, können die Sequenzen via Segregation entfernt werden. Ist eine Segregation nicht möglich, verbleiben die überflüssigen Sequenzen im Erbgut. Damit kann sich in gewissen Fällen die Frage stellen, wie das Vorkommen überflüssiger Sequenzen hinsichtlich der Definition der Cisgenese zu beurteilen ist. Da es sich in den meisten Fällen um kurze Sequenzen handelt,

dürften sich dazu im Erbgut der transformierten Pflanze homologe oder weitgehend homologe Sequenzen finden lassen, weshalb die Sequenzen wiederum als arteigen betrachtet werden könnten. Hinsichtlich der möglicherweise in cisgenen Pflanzen vorkommenden überflüssigen Sequenzen wird in der Literatur hauptsächlich das Vorkommen von Grenzsequenzen der T-DNA diskutiert. Dabei wird zuweilen auch explizit zwischen «Cisgenese» und «Cisgenese mit T-DNA-Grenzsequenzen» unterschieden (EFSA 2012, NTWG 2011).

2.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht

Die Cisgenese wird in der Pflanzenzüchtung eingesetzt, um bestehende Sorten genetisch zu verbessern. Da die Gene, die dabei benutzt werden, aus dem natürlichen Genpool der Sorte stammen, beruht die Cisgenese auf demselben genetischen Material, das auch bei der Kreuzungszüchtung von sexuell kompatiblen Pflanzen verwendet wird. Im Vergleich zur Kreuzungszüchtung bietet die Cisgenese jedoch den Vorteil, dass die gewünschten Gene ohne *linkage drag* übertragen werden können (Eckerstorfer et al. 2014, Lusser et al. 2011, Jacobsen & Schouten 2009). Die Cisgenese kann somit die Züchtung beschleunigen, da die langwierige Rückkreuzung zur Entfernung des *linkage drag* entfällt. Diese Zeiteinsparung ist vor allem bei Kulturarten von Bedeutung, die vegetativ vermehrt werden oder eine lange Generationszeit haben (Lusser et al. 2011, Schaart & Visser 2009). Zudem könnte sie auch in den Fällen eine wichtige Rolle spielen, in denen Resistenzgene pyramidiert werden sollen (Lusser et al. 2011).

Zu den Eigenschaften, die mittels Cisgenese in einer Sorte verbessert werden könnten, gehören unter anderem: Erhöhung der Krankheitsresistenz, veränderte Pflanzenarchitektur und verbesserte Futtermittelcharakteristika (Holme et al. 2012, Han et al. 2011, Vanblaere et al. 2011).

2.3 Stand der Entwicklung

Das Konzept der Cisgenese ist im Jahr 2000 erstmals vorgestellt (Holme et al. 2013) und dann mit den Publikationen von Schouten et al. (2006a/b) international bekannt gemacht worden. Seither sind in der Literatur vereinzelt cisgene Pflanzen beschrieben worden: bei Apfel (Chizzali et al. 2016, Kost et al. 2015, Krens et al. 2015, Würdig et al. 2015, Jänsch et al. 2014, Vanblaere et al. 2014/2011), Gerste (Holme et al. 2012) und Kartoffel (Jo et al. 2014). Zu den Kulturarten, bei denen über erste Schritte der Entwicklung cisgener Pflanzen berichtet worden ist, gehören Birne (Righetti et al. 2014), Chinakohl (Konagaya et al. 2013), Hartweizen (Gadaleta et al. 2008), Kastanie (Corredoira et al. 2012), Melone (Benjamin et al. 2009), Pappel (Han et al. 2011), Weinrebe (Dhekney et al. 2011) und Zitruspflanzen (An et al. 2013).

In Europa sind bisher für fünf cisgene Pflanzen Freisetzungsversuche beantragt worden (JRC 2015, BAFU 2015): für Schorf-resistente Äpfel (Niederlande), für Feuerbrand-robuste Äpfel (Schweiz), für Äpfel mit erhöhtem Anthocyaningehalt (Niederlande), für Phytophthora-resistente Kartoffeln (Belgien, Niederlande, Schweiz) und für Gerste mit verbesserter Phytaseaktivität (Dänemark).

3. Intragenese

Die Intragenese ist ein Konzept für die Transformation von Pflanzen. Im Gegensatz zur Transgenese, bei der Gene zwischen x-beliebigen Arten ausgetauscht werden, beinhaltet das Konzept der Intragenese, dass Pflanzen nur mit arteigenen Genen oder mit Genen von nah verwandten, sexuell kompatiblen Arten transformiert werden (Tabelle 2). Anders als bei der Cisgenese (Abschnitt 2) ist es bei der Intragenese möglich, das genetische Material vor der Transformation neu zu kombinieren (Holme et al. 2013, Lusser et al. 2012/2011, Molesini et al. 2012, Rommens et al. 2011/2007,

Rommens 2010/2007, Schaart & Visser 2009). Zudem besteht bei der Intragenese der Transformationsvektor aus funktionalen DNA-Fragmenten, die aus dem Erbgut der zu verändernden Art oder einer kreuzungskompatiblen Art stammen (Konzept des intragenen Vektors; Molesini et al. 2012, Rommens et al. 2011/2005, Conner et al. 2007, Rommens 2004).

3.1 Beschreibung des Verfahrens

Bei der Intragenese wird das Erbgut von Pflanzen mit einem oder mehreren Intragenen transformiert. Intragene sind neu kombinierte genetische Konstrukte, deren DNA-Sequenzen entweder von derselben Pflanzenart oder von einer verwandten, kreuzungskompatiblen Art stammen. Mögliche Neukombinationen sind unter anderem die Entfernung der Introns, der Austausch von Promotoren und Terminatoren, der Wechsel der Orientierung der kodierenden Sequenzen sowie die Verwendung von Haarnadel-Konstrukten (Molesini et al. 2012).

Intragene werden mit den gleichen Transformationsmethoden in das Erbgut einer Pflanze eingefügt, die bei der Herstellung transgener Pflanzen verwendet werden, beispielsweise mit biolistischen Verfahren oder mit Hilfe von Agrobakterien. Neben den etablierten Transformationsmethoden können auch NRE-Techniken (Abschnitt 6) für die Intragenese benutzt werden.

Tabelle 2: Transgenese und Intragenese – zwei unterschiedliche Strategien zur Transformation von Pflanzen (nach Molesini et al. 2012, Rommens et al. 2011).

	Transgenese	Intragenese
Quelle der kodierenden DNA-Sequenzen	Alle Arten	Dieselbe Art oder kreuzungskompatible Art
Quelle der regulatorischen DNA-Sequenzen	Alle Arten	Dieselbe Art oder kreuzungskompatible Art
Typ des genetischen Konstrukts	Neue Kombinationen von kodierenden und regulatorischen Sequenzen	Neue Kombinationen von kodierenden und regulatorischen Sequenzen
Orientierung der exprimierten Sequenz	<i>Sense</i> - oder <i>antisense</i> -Orientierung, Haarnadel-Konstrukte	<i>Sense</i> - oder <i>antisense</i> -Orientierung, Haarnadel-Konstrukte
T-DNA Grenzsequenzen	Linke und rechte Grenzsequenzen der <i>Agrobacterium</i> T-DNA	Linke und rechte Ränder der Transfer-DNA stammen von der Pflanze selbst oder von einer kreuzungskompatiblen Art
Selektierbare Markergene	Markergene vorhanden	Entweder keine Markergene vorhanden oder pflanzliche Markergene vorhanden

Da intragene Pflanzen per Definition keine artfremden Sequenzen enthalten sollen, muss ihre Herstellung so erfolgen, dass sie entweder einen intragenen Marker besitzen (Rosellini 2011) oder frei von Markergenen sind. Für die Herstellung Marker-freier intragener Pflanzen stehen unterschiedliche Strategien zur Verfügung. So ist es möglich, Markergene aus transformierten Pflanzen zu entfernen oder Pflanzen direkt ohne Markergene zu transformieren (Breyer et al. 2014).

Mit den gängigen Transformationsmethoden können zusammen mit den Intragenen auch noch weitere Sequenzen ins Erbgut einer Pflanze inseriert werden. Zu diesen Sequenzen gehören unter

anderem Grenzsequenzen der T-DNA und Vektor-Rückgrat-Sequenzen. Um zu vermeiden, dass damit artfremde Sequenzen ins Erbgut einer intragenen Pflanze gelangen, haben Forschende das Konzept der P-DNA beziehungsweise das Konzept des intragenen Vektors entwickelt (Holme et al. 2013, Rommens 2004, Rommens et al. 2004).

3.1.1 P-DNA-Konzept

Werden Intragene mit Hilfe von Agrobakterien in Pflanzenzellen eingeführt, erfolgt die Insertion via die T-DNA (Transfer DNA). Diese T-DNA ist an ihren beiden Enden von den so genannten linken (LG) und rechten (RG) Grenzsequenzen flankiert, die für die Insertion des Intragens erforderlich sind. LG und RG sind maximal 25 Basenpaare lang (Gelvin 2003). Der T-DNA-Strang, der ins Erbgut der Pflanze inseriert wird, enthält normalerweise 21-22 Nukleotide der LG und 3 bis 4 Nukleotide der RG (EFSA 2012, Schaart & Visser 2009, Conner et al. 2007), wobei es während der Insertion auch zu zufälligen Deletionen von Nukleotiden der LG und RG kommen kann. So kann die RG im Insert oft gänzlich fehlen und die inserierte LG auf zwei Nukleotide verkürzt sein (Prins & Kok 2010). Falls Sequenzen der LG und/oder RG zusammen mit dem Intragen ins Erbgut einer Pflanze inseriert werden, würde die Pflanze artfremde Sequenzen besitzen und deshalb nicht mehr unter die Definition der Intragenese fallen. Um dies zu verhindern, wird bei der Transformation anstelle der T-DNA P-DNA verwendet. P-DNA ist funktionell identisch mit der T-DNA. Ihre LG und RG bestehen jedoch aus Sequenzen, die von der zu transformierenden Pflanze selbst oder einer kreuzbaren Art stammen. Zur Herstellung von P-DNA werden hauptsächlich zwei Ansätze verfolgt. (I) Der erste Ansatz besteht darin, im Erbgut einer Pflanze Sequenzbereiche zu suchen, die soweit homolog mit den LG und RG der T-DNA von Agrobakterien sind, dass sie deren Funktion übernehmen können. Werden solche Sequenzen gefunden, können sie in der P-DNA als LG und RG eingesetzt werden (Rommens et al. 2005/2004). (II) Der zweite Ansatz besteht darin, im Erbgut einer Pflanze nach Sequenzbereichen zu suchen, die funktional die LG und RG der T-DNA ergeben, wenn sie zusammengesetzt werden (Conner et al. 2007). Die P-DNA wird somit *in silico* aus pflanzeigenen Sequenzen konstruiert. Im Falle der RG ist es des Weiteren möglich, einen dritten Ansatz zu verfolgen: Da normalerweise nur die ersten 3 bis 4 Nukleotide des RG ins Erbgut der Pflanze inseriert werden, lassen sich chimärische P-DNAs herstellen, bei denen die ersten vier Nukleotide des RG pflanzlichen Ursprungs sind und der Rest identisch mit der authentischen Agrobakterien RG ist (Conner et al. 2007).

3.1.2 Konzept des intragenen Vektors

Da bei der Transformation von Intragenen neben den LG und RG der T-DNA noch weitere Sequenzen aus dem Vektor ins Erbgut der Pflanze mit inseriert werden können, werden intragene Vektoren konstruiert, um die Insertion artfremder Sequenzen zu minimieren (Rommens et al. 2011, Conner et al. 2007). Das Konzept des intragenen Vektors besteht dabei darin, im Erbgut einer zu transformierenden Pflanze (oder einer sexuell kompatiblen Artverwandten) Sequenzen zu identifizieren, die funktional identisch sind mit Vektorsequenzen. Werden solche Sequenzen gefunden, können sie zur Konstruktion eines Vektors genutzt werden (Conner et al. 2007).

3.1.3 Definitive Aspekte

Die Intragenese ist ein Konzept, das in der Literatur unterschiedlich definiert wird. Zu den Aspekten, die in den jeweiligen Definitionen verschieden oder nicht behandelt werden, gehören folgende:

Codonveränderungen: Ein Intragen lässt sich synthetisch herstellen, weshalb es möglich ist, seine Sequenz an die Codonvorlieben der zu transformierenden Pflanze anzupassen. Inwiefern syntheti-

sche Gene mit optimierten Codons unter die Definition der Intragenese fallen oder nicht, ist unklar.

Quelle des eingefügten genetischen Materials: Was die Quelle der Intragene betrifft, werden bei den unterschiedlichen Definitionen der Intragenese verschiedene Begriffe verwendet: Die Sequenzen der intragenen Konstrukte können aus dem «natürlichen Genpool» einer Pflanze stammen oder aus dem «Genpool der Züchter» (*breeder's gene pool*) oder von «kreuzbaren Arten» oder von «sexuell kompatiblen Arten». Zu klären sein könnten dabei folgende Fragen: Können Gene, die sich allein via eine Brückenkreuzung in eine Pflanze einkreuzen lassen, als Intragene eingesetzt werden? Können Gene, die sich allein via Weite Kreuzungen und *embryo-rescue*-Verfahren in eine Pflanze übertragen lassen, als Intragene verwendet werden? Hängt die Antwort auf die beiden Fragen davon ab, ob die Gene bereits via Brückenkreuzung oder Weite Kreuzung übertragen worden sind und somit im Erbgut einer «direkt» kreuzbaren Art vorliegen?

3.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht

Die Intragenese kann in der Pflanzenzüchtung eingesetzt werden, um bestehende Sorten genetisch zu verbessern. Da sich das benutzte genetische Material vor der Transformation neu kombinieren lässt, bietet das Verfahren unterschiedlichste Möglichkeiten. So ermöglicht die Intragenese nicht nur die Expression neuer Gene, sondern auch die Stilllegung, die Überexpression oder die Änderung der Gewebeaktivität von endogenen Genen. Zu den Eigenschaften, die mittels Intragenese erzeugt werden könnten, gehören unter anderem: verbesserte Krankheitsresistenz, reduzierter Allergengehalt, veränderte Stärkezusammensetzung, erhöhte Vitaminmenge und verringerter Ligningehalt (siehe Rommens 2007).

3.3 Stand der Entwicklung

Das Konzept der Intragenese ist 2004 erstmals formuliert worden (Rommens 2004, Rommens et al. 2004). Seither ist die Entwicklung intragener Pflanzen bei verschiedenen Kulturarten in Angriff genommen worden (Holme et al. 2013, Rommens et al. 2011). Zu diesen Arten gehören: Apfel (Joshi et al. 2011), Erdbeere (Schaart 2004), Kartoffel (Brummel et al. 2015, Chawla et al. 2012, Rommens et al. 2008/2006/2004), Luzerne (Weeks et al. 2008), Pappel (Lu et al. 2015), Weidelgras (Puthigae et al. 2010), Weinrebe (Espinoza et al. 2013) und Zitruspflanzen (An et al. 2013).

In der EU sind bisher bei Apfel und Kartoffel Gesuche für Freisetzungsversuche mit intragenen Pflanzen eingegangen (JRC 2015, Lusser et al. 2011).

In den USA hat die Intragenese mit der Lancierung der *Innate*-Kartoffeln der Firma Simplot zu den ersten kommerziell erhältlichen Sorten geführt (Haltermann et al. 2015, Waltz 2015). Die *Innate*-Kartoffeln der ersten Generation, deren Anbau 2014 bewilligt worden ist, haben einen geringen Gehalt an Asparagin und laufen nicht braun an. Ihre Anbaufläche betrug 2015 rund 160 Hektar und soll 2016 auf 800 Hektar steigen (Transgen 2015). Die *Innate*-Kartoffel der zweiten Generation ist 2015 für den Anbau zugelassen worden. Sie weist im Vergleich zur ersten Generation zusätzlich eine Resistenz gegen *Phytophthora infestans* auf und soll 2017 auf den US-Markt kommen.

4. Pfropfen mit gentechnisch veränderten Wurzelstöcken

Pfropfen ist ein altes Verfahren, das im Wesentlichen daraus besteht, einen Zweig (Reiser) einer Sorte mit einer Unterlage (Wurzelstock) einer anderen Sorte zusammenzufügen. Wird die Pfropftechnik mit der Gentechnik kombiniert, lässt sich dies auf drei verschiedene Arten tun (Abbildung

2): (I) Pfropfen eines herkömmlichen Reisers auf einen gentechnisch veränderten Wurzelstock; (II) Pfropfen eines gentechnisch veränderten Reisers auf einen herkömmlichen Wurzelstock, und (III) Pfropfen eines gentechnisch veränderten Reisers auf einen gentechnisch veränderten Wurzelstock.

Die Fälle (I) und (II) werden in der Literatur auch als *Transgrafting* bezeichnet (Albacete et al. 2015, Song et al. 2015, Eckerstorfer et al. 2014, Lemgo et al. 2013, Haroldsen et al. 2012).

In den folgenden Abschnitten wird ausschliesslich der Fall (I) behandelt. Er wird in der Pflanzenzucht am häufigsten verfolgt und ist für die vorliegende Arbeit relevant, weil sich aus regulatorischer Sicht die Frage stellt, wie mit Nachkommen und Produkten des Reisers umzugehen ist.

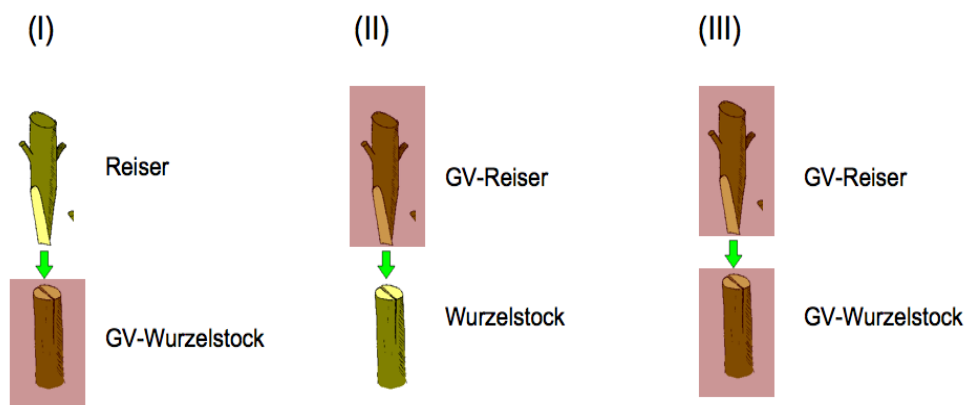


Abbildung 2: Die drei möglichen Arten von Chimären, die bei der Kombination von Pfropftechnik und Gentechnik entstehen können; GV = gentechnisch verändert. Bildquelle: Schouten

4.1 Beschreibung des Verfahrens

Das Verfahren kombiniert die Pfropftechnik mit der Gentechnik. Dabei werden als erstes gentechnisch veränderte Wurzelstöcke hergestellt. Dies geschieht, indem eine Pflanze mit gentechnischen Methoden (z.B. mittels Agrobakterien oder Biolistik) transformiert wird. Aus der transformierten Pflanze werden dann die Wurzelstöcke gewonnen. Schliesslich werden auf die gentechnisch veränderten Wurzelstöcke die Reiser gepfropft (Lusser et al. 2011).

Für die gentechnische Veränderung der Wurzelstöcke können Transgene, Cisgene, Intragene oder andere genetische Konstrukte eingesetzt werden (Song et al. 2015, Lusser & Davies 2013).

4.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht

Die Pfropftechnik kommt hauptsächlich bei Zier- und Obstbäumen, Gemüse und Blumen zum Einsatz. Bei allen pflanzbaren Arten, die mit gentechnischen Methoden transformierbar sind, lassen sich Chimären aus gentechnisch nicht veränderten Reisern und gentechnisch veränderten Wurzelstöcken herstellen.

Das Pfropfen von herkömmlichen Reisern auf gentechnisch veränderte Wurzelstöcke kann in der Pflanzenzucht hauptsächlich für die drei im Folgenden aufgeführten Ziele angewandt werden:

1. *Einsatz von Wurzelstöcken mit neuen Eigenschaften:* Wurzelstöcke werden so gentechnisch verändert werden, dass sie gegen bodenbürtige Krankheiten resistent sind oder verbesserte Durchwurzelungseigenschaften besitzen (z.B. Geier et al. 2008, Park et al. 2005). Beides kann den Ertrag der an den Reisern geernteten Produkte erhöhen.

2. *Veränderung der Eigenschaften des Reisers*: Wurzelstöcke werden so gentechnisch verändert, dass sie Proteine oder siRNAs bilden, die in den Reiser transportiert werden und dadurch die Eigenschaften des Reisers in erwünschter Weise verändern (Song et al. 2015, Zhao & Song 2014, Kasai et al. 2011, Notaguchi et al. 2008, Dutt et al. 2007). Auf diesem Wege lassen sich neue Eigenschaften in eine Reihe genetisch unterschiedlicher Reiser einführen, ohne dass diese selbst gentechnisch verändert werden müssen (Lusser et al. 2011).

3. *Hilfsmittel für andere Züchtungsverfahren*: wie unter 2. werden die Wurzelstöcke so verändert, dass sie Proteine oder siRNAs bilden, die in den Reiser transportiert werden. Das Ziel ist dabei jedoch nicht, im Reiser direkt kommerzielle Eigenschaften zu induzieren, sondern vielmehr die Ermöglichung von Züchtungsverfahren wie zum Beispiel die Blühverfrühungs-Technik (Febres et al. 2011, Zhang et al. 2010; Abschnitt 15), das *Reverse Breeding* (Dirks et al. 2009; Abschnitt 18) oder das RdDM (Bai et al. 2011; Abschnitt 13).

Zusätzlich zu den genannten drei Anwendungszielen wird auch diskutiert, Wurzelstöcke mit transformierten Plastiden für die Pflanzenzüchtung zu verwenden (Wani et al. 2015, Bock 2014, Thyssen et al. 2012, Stegemann et al. 2012). Da Chloroplasten aus dem Wurzelstock in den Reiser wandern können, wird es möglich, transplastomische Wurzelstöcke zu nutzen, um transformierte Plastide in verschiedene Sorten einzubringen (Thyssen et al. 2012) oder um transplastomische Sorten bei solchen Pflanzenarten zu züchten, deren Plastide sich nicht transformieren lassen (Stegemann et al. 2012). Da diese Anwendungen zu transplastomischen Pflanzen und damit zu GVO führen, werden sie im Folgenden nicht weiter behandelt.

4.3 Stand der Entwicklung

Die Nutzung gentechnisch veränderter Wurzelstöcke wird hauptsächlich an Gehölzen erprobt, so unter anderem an Apfel (Smolka et al. 2010, Xu et al. 2009, Zhu et al. 2001), Kirsche (Zhao & Song 2014, Song et al. 2013), Orange (La Malfa et al. 2009) Pappel (Wang et al. 2012), Pflaume (Nagel et al. 2010), Wassermelone (Kim et al. 2015a, Han et al. 2015/2009, Youk et al. 2009, Park et al. 2005), Walnuss (Vahdati et al. 2002) und Weinrebe (Krastanova et al. 2010, Hemmer et al. 2009, Aguero et al. 2005, Gambino et al. 2005, Geier et al. 2008, Vigne et al. 2004, Coutos-Thevenot et al. 2001). Zudem wird der Einsatz gentechnisch veränderter Wurzelstöcke auch bei Gurke, Erbse, Kartoffel, Tabak und Tomate untersucht (Übersicht bei Lusser et al. 2011). In einigen Fällen sind gentechnisch veränderte Wurzelstöcke auch bereits in Freisetzungsversuchen untersucht worden. In der EU beispielsweise sind für Apfel, Birne, Citrange, Pflaume, Orange und Weinrebe entsprechende Gesuche eingereicht worden (JRC 2015).

5. TraitUp-Verfahren

Das TraitUp-Verfahren nutzt rekombinante Geminivirus-basierte Plasmide, um Pflanzen mit neuen Eigenschaften zu erzeugen. Die Plasmide werden dazu in die Pflanzen gebracht, wo sie autonom replizieren, aber nicht ins Erbgut integrieren (Sela et al. 2014). Da die Plasmide nicht weitervererbt werden, können die Nachkommen der behandelten Pflanzen frei von rekombinanter DNA sein (Morflora 2014).

5.1 Beschreibung des Verfahrens

Das TraitUp-Verfahren beruht auf dem Einsatz rekombinanter IL-60- oder p1470-Plasmide (Gover et al 2014, Mozes-Koch et al. 2012, Peretz et al. 2007). Die beiden Plasmide sind «entwaffnete» Formen des *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) und sind so konstruiert, dass sie sich innerhalb

einer Pflanze ausbreiten und dauerhaft autonom replizieren können, ohne dass sie ins Erbgut der Pflanze inseriert werden. Die Plasmide lassen sich direkt in die Samen von Pflanzen einbringen (Lapidot et al. 2014). Da sie mit Expressionskassetten oder RNAi-Konstrukten ausgestattet werden können, lassen sich Pflanzen erzeugen, die fremde Gene exprimieren oder stillgelegte Gene aufweisen (Mozes-Koch et al. 2012, Peretz et al. 2007). Nach gegenwärtigem Stand des Wissens werden die Plasmide nicht weitervererbt.

5.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht

Mit dem TraitUp-Verfahren lassen sich ähnliche Ziele verfolgen wie mit der Trans-, Cis- oder Intra-genese. Anders als bei diesen Transformations-basierten Verfahren werden die erwünschten Eigenschaften jedoch nicht während eines langwierigen Züchtungsprozesses erzeugt, sondern durch die Behandlung des Saatguts mit rekombinanten Plasmiden.

5.3 Stand der Entwicklung

TYLCV-basierte Plasmide sollen in mehr als 40 verschiedenen Kulturarten exprimierbar sein (Dietz 2013), so zum Beispiel in Mais, Weizen, Gerste, Banane, Pfeffer, Olive, Soja, Karotte und Tomate (Peretz et al. 2007). Konkrete Anwendungsbeispiele finden sich gegenwärtig kaum. Bei Tomate ist es gelungen, ein komplettes bakterielles Operon zu exprimieren, was dazu führte, dass die Pflanze das Antibiotikum Pyrrolnitrin bildete (Mozes-Koch et al. 2012). Zudem wird bei Tomaten daran gearbeitet, Sorten zu entwickeln, die gegen die Welkekrankheit resistent sind (Braverman 2013). Bei Apfel wird das Verfahren erprobt, um Schorf-resistente Sorten zu erzeugen (Cusin et al. 2014).

6. NRE-Technik

Die NRE-Technik (NRE= Neue Restriktionsenzyme) ist ein neues Züchtungsverfahren, bei dem ortsspezifische Nukleasen dazu benutzt werden, um das Erbgut von Pflanzen gezielt zu verändern (Baltés & Voytas 2015, Lee et al. 2015, Kim et al. 2015b, Osakabe & Osakabe 2015a/b, Rinaldo & Ayliffe 2015, Weeks et al. 2015, Xiong et al. 2015, Fichtner et al. 2014, Chen & Gao 2014, Kathiria & Eudes 2014, Nakayama et al. 2014, Pauwels et al. 2014, Puchta & Fauser 2014, Voytas & Gao 2014, Podevin et al. 2013, Voytas 2013, Curtin et al. 2012, Tzfira et al. 2012). Gentechnische Methoden kommen während des Verfahrens zum Einsatz, um Gene, die für ortsspezifische Nukleasen kodieren, in Pflanzenzellen einzuführen. Da diese Gene im Endprodukt nicht mehr benötigt werden, können aus der NRE-Technik Pflanzen hervorgehen, die frei von extrazellulär eingeführten DNA-Sequenzen sind (z.B. Wolt et al. 2015, Voytas & Gao 2014, Pauwels et al. 2014).

In der Literatur finden sich unterschiedliche Bezeichnungen für das NRE-Verfahren. Dazu gehören *genome editing* (Sprink et al. 2015, Kathiria & Eudes 2014), *genome editing with engineered nucleases* (GEEN, Osakabe & Osakabe 2015a/b), *precision genetic engineering* (PGE; Nakayama et al. 2014), *precision genetic modification (PGM)-techniques* (Fichtner et al. 2014), *targeted genome modification (TagMo)-technologies* (Kokotovich & Kuzma 2014), *nuclease-based gene targeting* (NBGT; Pauwels et al. 2014), *site-directed nuclease (SDN)-techniques* (Lusser & Davies 2013), *site-specific nuclease (SSN)-techniques* (Chen & Gao 2014) und *nuclease-mediated site-directed mutagenesis* (Eckerstorfer et al. 2014).

6.1 Beschreibung des Verfahrens

Die NRE-Technik beruht auf dem Einsatz ortsspezifischer Nukleasen und der Ausnutzung zelleigener DNA-Reparaturprozesse der Pflanzen. Die ortsspezifischen Nukleasen werden dabei genutzt,

um an vorbestimmten Orten des Erbguts der Pflanzen Doppelstrangbrüche herbeizuführen. Dort, wo die Nukleasen einen Doppelstrangbruch erzeugt haben, beginnen pflanzeigene Reparaturprozesse. Die Reparatur des Doppelstrangbruchs erfolgt dabei entweder durch nicht-homologe Verknüpfung (*non-homologous end joining*, NHEJ) oder, falls ein DNA-Molekül mit Homologien zur gebrochenen Sequenz vorhanden ist, durch homologe Rekombination (HR). Das NHEJ führt an der Bruchstelle zur Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden. Die HR wiederum hat zur Folge, dass es an der Bruchstelle zum Genaustausch oder zur Insertionen neuer Gene kommt. Im Folgenden wird beschrieben, welche Typen von Nukleasen beim NRE-Verfahren eingesetzt werden können, welche Kategorien von Veränderungen sich mit den Nukleasen erzeugen lassen, und welche Methoden es gibt, die Nukleasen in Pflanzenzellen einzuschleusen.

6.1.1 Nuklease-Typen

Gegenwärtig stehen für die NRE-Technik hauptsächlich vier Typen ortsspezifischer Nukleasen zur Verfügung (Baltas & Voytas 2015, Rinaldo & Ayliffe 2015, Weeks et al. 2015, Puchta & Fauser 2014): Meganukleasen (MN), Zinkfinger nukleasen (ZFN), TALE-Nukleasen (TALEN) und CRISPR/Cas9. Erprobt werden zudem auch RNA-geleitete FokI-Nukleasen sowie Nickasen (Lee et al. 2015).

Meganukleasen (MN): MN sind natürlich vorkommende Endonukleasen, die in der Regel DNA-Abschnitte von einer Länge zwischen 12 und 40 Basenpaaren erkennen. MN können gezielt verändert werden, um ihre Erkennungssequenzen anzupassen (Rinaldo & Ayliffe 2015).

Zinkfinger-Nukleasen (ZFN): ZFN sind synthetisch hergestellte Nukleasen, die aus einer DNA-Bindungsdomäne aus Zinkfingern und der Nukleasedomäne des FokI-Restriktionsenzym bestehen. ZFN werden in der Regel so konstruiert, dass sie einen bestimmten, 9 bis 18 Basenpaar langen DNA-Abschnitt erkennen können. Da die FokI-Aktivität eine Dimerisierung benötigt, braucht es jeweils zwei ZFN, um an einem vorbestimmten Ort des Erbguts einen Doppelstrangbruch erzeugen zu können (Lee et al. 2015).

TALE-Nukleasen (TALEN): TALEN sind wie ZFN künstlich hergestellte Nukleasen. Sie bestehen aus der DNA-Bindungsdomäne von *transcription activator-like effector* (TALE)-Proteinen und der Nukleasedomäne des FokI-Restriktionsenzym. TALEN können so designt werden, dass sie einen bestimmten, 30 bis 40 Basenpaar langen DNA-Abschnitt erkennen (Kim & Kim 2014). Da die FokI-Aktivität eine Dimerisierung benötigt, braucht es wie bei den ZFN jeweils zwei TALEN, um eine funktionsfähige Nuklease zu erhalten.

CRISPR/Cas9: Das CRISPR/Cas9-System besteht aus zwei Komponenten: der Cas9-Nuklease und einer sogenannten Guide RNA (gRNA). Die gRNA leitet die Cas9-Nuklease zu einem vorbestimmten Ort im Erbgut, wo diese einen Doppelstrangbruch erzeugt. Als DNA-spezifisches Erkennungsteil kann die gRNA so konstruiert werden, dass sie einen rund 20 Basenpaar langen DNA-Abschnitt erkennen kann (Belhaj et al. 2015).

RNA-geleitete FokI-Nukleasen: Eine RNA-geleitete FokI-Nuklease ist ein künstlich hergestelltes Fusionsprodukt aus der Nukleasedomäne des FokI-Restriktionsenzym und einer katalytisch inaktiven Cas9-Nuklease (dCas9 genannt). Die Erkennung der DNA erfolgt wie bei CRISPR/Cas9 durch eine gRNA. Da die FokI-Aktivität eine Dimerisierung benötigt, braucht es jeweils zwei *RNA-geleitete FokI-Nukleasen*, um an einem vorbestimmten Ort des Erbguts einen Doppelstrangbruch erzeugen zu können (Lee et al. 2015, Bortesi & Fischer 2015).

Nickasen: Nickasen sind künstlich hergestellte Enzyme, die an vorbestimmten Orten des Erbguts Einzelstrangbrüche erzeugen. Sie lassen sich aus ZFN, TALEN und CRISPR/Cas9 entwickeln und

sollen es möglich machen, an der Bruchstelle homologe Rekombinationen zu induzieren, ohne dabei das NHEJ zu aktivieren (Lee et al. 2015, Kim & Kim 2014).

6.1.2 Kategorisierung der erzeugbaren Veränderungen

Mit der NRE-Technik lässt sich eine Vielzahl unterschiedlicher Veränderungen im Erbgut von Pflanzen erzeugen. Um ihre Beschreibung zu vereinfachen und eine Diskussion ihrer Regulierungsaufsicht zu erleichtern, ist in der Literatur eine Zuordnung der möglichen Veränderungen in drei Kategorien vorgeschlagen worden (Podevin et al. 2013, Lusser et al. 2011). Dieser Kategorisierung wird hier weitgehend gefolgt, wobei zusätzlich eine vierte Kategorie angeführt wird (Abbildung 3). Keiner dieser vier Kategorien direkt zuzuordnen ist die sogenannte Mehrfachgenomeditorierung (*multiplex genome editing*). Sie beschreibt Anwendungen der NRE-Technik, bei der gleichzeitig zwei oder mehrere verschiedene, vorbestimmte Orte des Erbguts verändert werden.

NRE-1: Diese Kategorie beschreibt die Anwendung der NRE-Technik, bei der an einem vorbestimmten Ort des Erbguts unspezifische Mutationen erzeugt werden. Die Nukleasen werden dazu ohne Reparaturmatrize in Pflanzenzellen eingeschleust. Innerhalb der Zelle binden die Nukleasen an den vorbestimmten Ort und erzeugen dort einen Doppelstrangbruch. Die Reparatur der Bruchstelle erfolgt durch NHEJ, wodurch Indels erzeugt werden. Mit der NRE-1-Technik lassen sich gezielt Gene ausschalten (Gen-Knockout; Podevin et al. 2013, Lusser et al. 2011).

NRE-2: Diese Kategorie beschreibt die Anwendung der NRE-Technik, bei der an einem vorbestimmten Ort des Erbguts spezifische Mutationen erzeugt werden. Zusätzlich zu den Nukleasen werden dabei Reparaturmatrizen in Pflanzenzellen eingeschleust. Die Matrizen können dsDNA-Vektoren, ssDNA-Oligonukleotide (z.B. Svitashv et al. 2015) oder ssRNA/DNA-Oligonukleotide (Wang et al. 2015a) sein und weisen – abgesehen von den auszutauschenden Nukleotiden – Homologie zur chromosomalen Sequenz auf, in der die Nukleasen einen Doppelstrangbruch einführen. Die Reparatur der Bruchstelle erfolgt durch homologe Rekombination zwischen den gebrochenen Genomsequenzen und der beigefügten Matrize. Mit der NRE-2-Technik lassen sich Gene austauschen bzw. unerwünschte Spontanmutationen korrigieren oder gezielt neue Mutationen einfügen (Podevin et al. 2013, Lusser et al. 2011).

NRE-3: Diese Kategorie beschreibt die Anwendung der NRE-Technik, bei der an einem vorbestimmten Ort des Erbguts Gene inseriert werden. Die Nukleasen werden dabei zusammen mit einer Donor-DNA in Pflanzenzellen eingeschleust. Die Donor-DNA enthält die Sequenz, die inseriert werden soll, sowie flankierende Sequenzen, die Homologien zum Zielort aufweisen. Die Insertion der Sequenzen der Donor-DNA erfolgt via homologe Rekombination. Mit der NRE-3-Technik lassen sich Cisgene, Intragene, Transgene oder RNAi-Konstrukte gezielt ins Erbgut einfügen. Gleichzeitig ist es möglich, pflanzeigene Gene gezielt auszuschalten (Podevin et al. 2013, Kim & Kim 2011, Lusser et al. 2011). Pflanzen, die aus dem NRE-3-Verfahren hervorgehen, sind nach geltendem Recht GVO.

NRE-4: Diese Kategorie beschreibt die Anwendung der NRE-Technik, bei der chromosomale Deletionen, Inversionen, Duplikationen oder Translokationen erzeugt werden. Mit Hilfe von Nukleasen werden dabei an zwei vorbestimmten Orten des Erbguts Doppelstrangsbrüche erzeugt. Liegen die Brüche auf einem Chromosom, kann es zur Deletion oder Inversion der Sequenz zwischen den Brüchen kommen. Liegen die Doppelstrangbrüche auf zwei verschiedenen Chromosomen, kann eine Translokation resultieren (Baltas & Voytas 2015, Puchta & Fauser 2014, Podevin et al. 2013). Wie bei NRE-1 erfolgt die Reparatur der Doppelstrangbrüche jeweils via NHEJ.

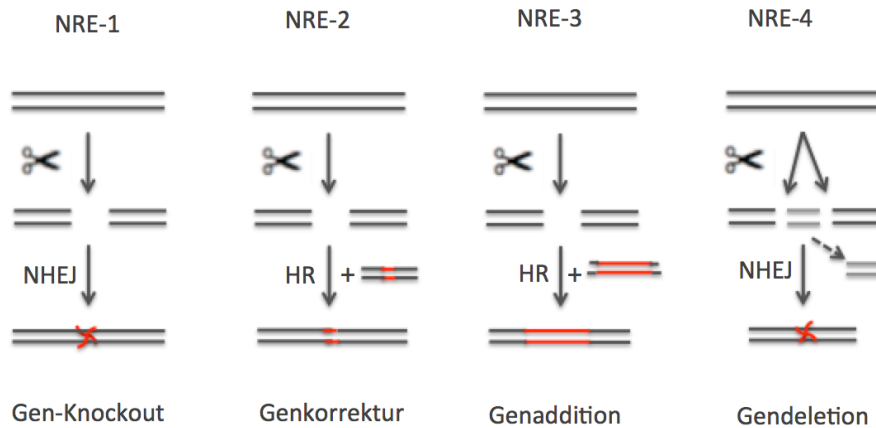


Abbildung 3: Vereinfachte schematische Darstellung der NRE-Varianten 1 bis 4. Nicht dargestellt sind die chromosomale Inversion, Duplikation und Translokation. Zur näheren Beschreibung der Varianten siehe Haupttext.

6.1.3 Methoden zum Einschleusen der Nukleasen

Um die beschriebenen Veränderungen mit den ortsspezifischen Nukleasen erzeugen zu können, müssen diese Nukleasen und gegebenenfalls weitere Reagenzien wie gRNA, Donor-DNA oder Reparaturmatrizen in Pflanzenzellen gebracht werden. Das Einschleusen der Nukleasen erfolgt gegenwärtig in Form von Nukleinsäuren. Zudem ist es möglich, die Nukleasen in Form von Proteinen in die Zellen einzubringen (Woo et al. 2015, Luo et al. 2015, Martin-Ortigosa et al. 2014).

Um Gene, die für ortsspezifische Nukleasen und gegebenenfalls für weitere Reagenzien wie gRNA, Reparaturmatrizen oder Donor-DNA kodieren, in Pflanzenzellen einzubringen, stehen vier gentechnische Methoden zur Verfügung: Transformation, transiente Transfektion, VUGE (Abschnitt 22) und Agrobioinfiltration (Voytas & Gao 2014, Tzfira et al. 2012, Mahfouz & Li 2011)

Transformation: Die Nuklease-kodierenden Gene werden mit Transformationsmethoden ins Erbgut von Pflanzen inseriert. In den transformierten Pflanzen kommt es zu einer stabilen oder induzierten Expression und die Nukleasen führen am vorbestimmten Ort des Genoms einen Doppelbruch ein. Am Ende des Prozesses können die Nuklease-kodierenden Gene via Segregation entfernt werden, wodurch Pflanzen entstehen, die Transgen-frei sind (Voytas & Gao 2014).

Transiente Transfektion: Plasmide mit Nuklease-kodierenden Genen werden in Protoplasten oder Zellsuspensionen eingebracht. Dort werden die Nuklease-kodierenden Gene vorübergehend exprimiert, bevor das Plasmid abgebaut wird (Voytas & Gao 2014). Aus den transfektierten Protoplasten können Pflanzen regeneriert werden, die Transgen-frei sind.

VUGE: Die Nuklease-kodierenden Gene werden mit Hilfe viraler Vektoren (VUGE, Abschnitt 22) in Pflanzen eingeführt (Ali et al. 2015a/b, Honig et al. 2015, Baltés et al. 2014, Vainstein et al. 2011, Marton et al. 2010). In der infiltrierten Pflanze breitet sich der rekombinante Virus aus, die Nuklease-kodierenden Gene werden exprimiert und die Nukleasen führen am vorbestimmten Ort des Genoms einen Doppelbruch ein. Je nach Vektor lassen sich dabei auf drei Wegen Virus-freie Nachkommen gewinnen (Vainstein et al. 2011): (I) Regeneration von mutiertem Gewebe und eventueller Eliminierung der Viren durch eine Meristemkultur; (II) Vegetative Vermehrung von mutierten Seitentrieben und eventueller Eliminierung der Viren durch eine Meristemkultur, (III) Gewinnung Virus-freier Samen, falls sich aus mutierten Trieben Blüten bilden und der eingesetzte Virus nicht via Samen übertragen wird.

Agroinfiltration: Die Nuklease-kodierenden Gene werden mit Hilfe von Agrobakterien (Abschnitt 14) vorübergehend in Pflanzen eingeführt (Mahfouz & Li 2011). In den infiltrierten Pflanzen kommt es zur Expression und die Nukleasen führen am vorbestimmten Ort des Erbguts einen Doppelstrangbruch ein. Der infiltrierten Pflanze werden dann Zellen entnommen, die *in vitro* wieder zu Pflanzen regeneriert werden. Da die Agroinfiltration ohne Insertion der eingeführten Sequenzen ablaufen kann, können regenerierte Pflanzen gewonnen werden, die frei von Transgenen sind.

6.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht

Die NRE-Techniken und insbesondere das CRISPR/Cas9-System gelten als besonders viel versprechende neue Verfahren für die Pflanzenzüchtung (z.B. Balthes & Voytas 2015, Belhaj et al. 2015). Indem sie es möglich machen, im Erbgut von Pflanzen Gene gezielt auszuschalten, Gene gezielt zu korrigieren oder neue Gene an einem vorbestimmten Ort einzufügen, wird das Erreichen einer Vielzahl unterschiedlicher Züchtungsziele denkbar. Zu diesen Zielen gehören unter anderem: Herbizidtoleranz, Krankheits- und Schädlingsresistenz, Ertragssteigerung, Verlängerung der Lagerungsbeständigkeit, Verbesserungen des Ernährungswerts und Optimierung der Öl- oder Stärkezusammensetzung (Podevin et al. 2013).

6.3 Stand der Entwicklung

Obwohl die NRE-Technik ein relativ neues Pflanzenzuchtverfahren ist, ist sie bereits an zahlreichen Kulturpflanzen erprobt worden (siehe Übersichten in Balthes & Voytas 2015, Weeks et al. 2015). In den weitaus meisten Fällen sind dabei pflanzeigene Gene gezielt ausgeschaltet worden (NRE-1). Auch die Machbarkeit des Genaustausches (NRE-2), der Geninsertion und der Genstapelung (NRE-3) sowie der Gendeletion (NRE-4) sind vereinzelt an Kulturpflanzen gezeigt worden. Mit CRISPR/Cas9 ist zudem die Mehrfachgenomeditierung gelungen.

Im Folgenden wird beschrieben, bei welchen Kulturarten MN, ZFN, TALEN und CRISPR/Cas9 bisher erprobt worden sind.

MN: Veröffentlichungen zu Anwendungen von MN an Kulturpflanzenarten gibt es bisher bei Mais (Djukanovic et al. 2013, Gao et al. 2010) und Baumwolle (D'Halluin et al. 2013). Der Grund für die wenigen Veröffentlichungen dürfte darin liegen, dass es – insbesondere im Vergleich zu ZFN und TALEN – sehr viel Aufwand braucht, um die DNA-Bindungsdomäne von MN so zu verändern, dass eine Bindung am erwünschten Ort im Erbgut erfolgt. Wegen der mangelnden Flexibilität wird denn auch davon ausgegangen, dass MN keine wichtige Rolle in der Pflanzenzüchtung spielen werden (Puchta & Fauser 2014). Eine Übersicht über Anwendungen von MN bei Pflanzen geben Daboussi et al. (2015).

ZFN: 2005 ist an den Modellpflanzen Tabak und Arabidopsis erstmals gezeigt worden, dass sich das Erbgut von Pflanzen mit ZFN gezielt verändern lässt (Lloyd et al. 2005, Wright et al. 2005). Seitdem sind ZFN bei verschiedenen Kulturarten erfolgreich eingesetzt worden – zum Beispiel bei Apfel (Peer et al. 2015), Feige (Peer et al. 2015), Mais (Ainley et al. 2013, Shukla et al. 2009), Petunie (Marton et al. 2010), Reis (Cantos et al. 2014) und Soja (Curtin et al. 2011). Übersichten über die Anwendungen von ZFN bei Pflanzen finden sich bei Petolino (2015), Petolino et al. (2015) und Qi (2015).

TALEN: Die ersten Veröffentlichungen über Anwendungen von TALEN an Pflanzen stammen aus dem Jahr 2011 (Cermak et al. 2011, Mahfouz et al. 2011). Seither sind TALEN bei mehreren Kulturarten erprobt worden. Zu diesen Arten gehören Gemüsekehl (Sun et al. 2013), Gerste (Gurusaidze et al. 2014, Wendt et al. 2013), Kartoffel (Clasen et al. 2016, Nicolai et al. 2015), Mais (Char et al. 2015, Liang et al. 2014), Reis (Zhang et al. 2016, Ma et al. 2015a, Shan et al.

2015/2013a, Wang et al. 2015a, Chen et al. 2014, Li et al. 2012), Soja (Du et al. 2016, Haun et al. 2014), Tabak (Zhang et al. 2013, Mahfouz et al. 2011), Tomate (Cermak et al. 2015, Lor et al. 2014) und Weizen (Wang et al. 2014). Eine Übersicht über bisherige Anwendungen von TALEN an Pflanzen geben Sprink et al. (2015).

CRISPR/Cas9: Die ersten Veröffentlichungen, die zeigen, dass CRISPR/Cas9 bei Pflanzen anwendbar ist, sind im Jahr 2013 erschienen (Belhaj et al. 2013, Feng et al. 2013, Jiang et al. 2013, Li et al. 2013, Mao et al. 2013, Miao et al. 2013, Nekrasov et al. 2013, Shan et al. 2013b, Xie & Yang 2013). Seither sind die Anwendungen von CRISPR/Cas9 bei Pflanzen in zahlreichen weiteren Untersuchungen gezeigt worden. Zu den Kulturarten, bei denen CRISPR/Cas9 bisher erprobt worden ist, gehören Gemüse Kohl (Lawrenson et al. 2015), Gerste (Lawrenson et al. 2015), Kartoffel (Wang et al. 2015b), Mais (Feng et al. 2015, Svitashv et al. 2015, Liang et al. 2014, Xing et al. 2014a), Mohrenhirse (Jiang et al. 2013), Orange (Jia & Wang 2014), Pappel (Fan et al. 2015), Reis (Endo et al. 2015a, Lowder et al. 2015, Ma et al. 2015b, Mikami et al. 2015, Xie et al. 2015, Xu et al. 2015/2014, Zhang et al. 2014, Feng et al. 2013, Jiang et al. 2013, Mao et al. 2013, Shan et al. 2013b, Xie & Jang 2013), Soja (Du et al. 2016, Cai et al. 2015, Jacobs et al. 2015, Li et al. 2015, Sun et al. 2015, Michno et al. 2015), Tabak (Gao et al. 2015), Tomate (Cermak et al. 2015, Ito et al. 2015, Brooks et al. 2014, Ron et al. 2014) und Weizen (Wang et al. 2014, Shan et al. 2013b, Upadhyay et al. 2013). Übersichten über die Anwendungen von CRISPR/Cas9 bei Pflanzen finden sich bei Belhaj et al. (2015), Bortesi & Fischer (2015), Chen & Gao (2015), Kumar & Jain (2015) und Schaeffer & Nakata (2015).

7. Oligonukleotid-dirigierte Mutagenese (ODM)

Die Oligonukleotid-dirigierte Mutagenese (ODM) ist ein Verfahren, bei dem synthetische Oligonukleotide in lebende Zellen eingeführt werden, um an vorbestimmten Stellen des Erbguts Mutationen einzufügen (Gocal et al. 2015, Sauer et al. 2015, Lusser et al. 2012/2011, Breyer et al. 2009, Iida & Terada 2005, Oh & May 2001).

ODM ist ein generischer Begriff, der für verschiedene Ansätze und Anwendungen steht. In der Fachliteratur werden eine Reihe verschiedener Namen für die ODM verwendet¹ (Lusser et al. 2011, Breyer et al. 2009).

7.1 Beschreibung des Verfahrens

Mit der ODM lassen sich gezielt Mutationen in einem bis maximal vier aneinander liegenden Nukleotiden einer endogenen DNA-Sequenz einführen (Lusser et al. 2011). Die Mutation kann dabei zur Substitution, Insertion oder Deletion eines Nukleotids führen und Promotor- oder Gensequenzen betreffen. Die Auslösung der Mutation erfolgt durch die Zugabe von Oligonukleotiden (Oligos). Diese Oligos werden synthetisch hergestellt und weisen – abgesehen von den auszutauschenden Nukleotiden – Homologien zur Zielsequenz auf. Die Mutationen erfolgen durch einen zelleigenen Genreparaturmechanismus (Rivera-Torres & Kmiec 2015, Lusser et al. 2011). Was die Oligos betrifft, ist zu erwarten, dass sie nicht ins Erbgut integrieren, sondern innerhalb der Zelle abgebaut werden.

¹ Zu diesen Namen gehören: *targeted nucleotide exchange*, *targeted gene repair*, *targeted gene correction*, *chimeraplasty*, *genoplasty*, *oligonucleotide-mediated gene editing*, *chimeric oligonucleotide-dependent mismatch repair*, *oligonucleotide-mediated gene repair*, *triplex-forming oligonucleotide-induced recombination*, *oligodeoxynucleotide-directed gene modification*, *therapeutic nucleic acid repair approach*, *RNA-mediated DNA modification*, *RNA-templated DNA repair*, *induced targeted mutagenesis*, *chimeric oligonucleotide dependent mismatch repair* (Lusser et al. 2011, Beyer et al. 2009a).

Die Oligos, die bei der ODM eingesetzt werden, sind synthetisch hergestellte, 20 bis 100 Basen beziehungsweise Basenpaare lange Nukleinsäuren (Lusser et al. 2011, Connor 2010). Für die Mutagenese von Pflanzenzellen werden vorwiegend zwei Typen von Oligos verwendet: RNA-DNA-Oligonukleotide (RDO; Abbildung 4) oder einzelsträngige DNA-Oligonukleotide (Sauer et al. 2015). Weitere Typen, die ebenfalls benutzt werden könnten, sind: RNA-Oligonukleotide, Tripelhelix formende Oligonukleotide (TFO) sowie Oligos mit chemisch modifizierten Nukleinsäuren wie beispielsweise Peptid-Nukleinsäuren (PNA) oder so genannten *locked* Nukleinsäuren (LNA) (COGEM 2010, Connor 2010, Breyer et al. 2009).

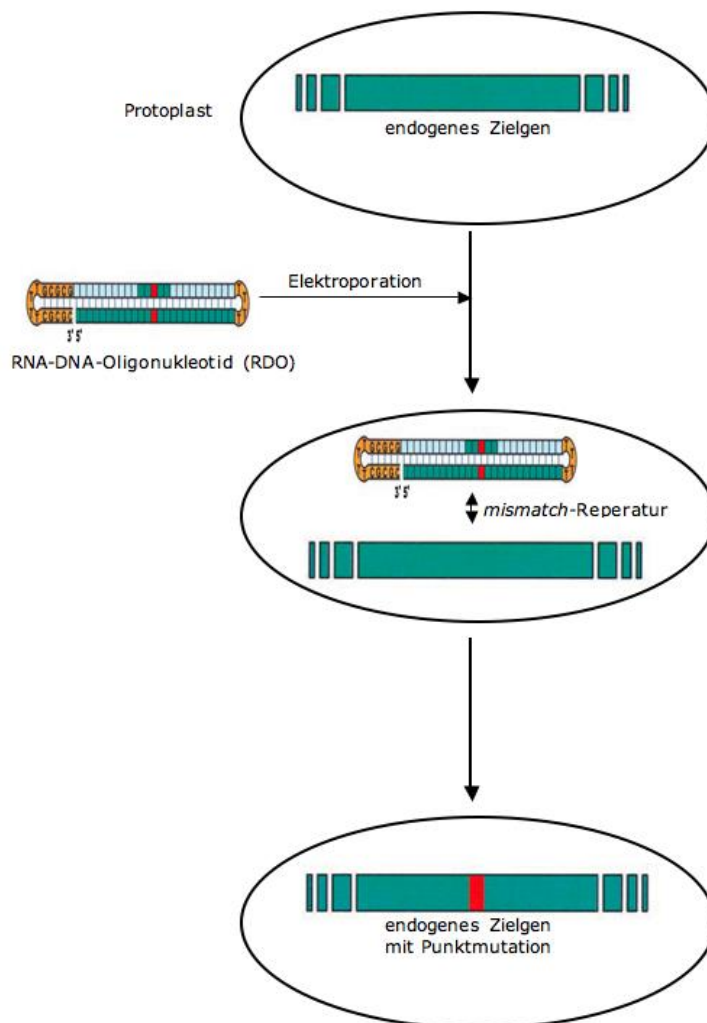


Abbildung 4: Vereinfachte schematische Darstellung des ODM-Verfahrens für den Fall, dass RNA-DNA-Oligonukleotide (RDO) in Protoplasten eingefügt werden. Farbcode des RDO: grün = DNA-Sequenzen, die homolog zum Zielgen sind; hellgrün = RNA-Sequenzen, die homolog zum Zielgen sind; rot = *mismatch*; orange = Schleifen aus Thymidin und «GC-Klemmen». Verändert nach Hohn & Puchta (1999).

Das Einführen der Oligos in lebende Zellen ist mit verschiedenen Methoden möglich. Dazu gehören: biolistische Verfahren, Elektroporation, PEG-vermittelte Transfektion, Mikroinjektion und Lipofektion (Mikroverkapselung). Die Wahl der Methode hängt dabei unter anderem davon ab, in welche Zellen die Oligos eingebracht werden sollen. Bei Pflanzen werden üblicherweise die Elektropo-

ration oder biolistische Verfahren eingesetzt (Gocal et al. 2015, Sauer et al. 2015). Unabhängig von der Wahl der Methode erfolgt das Einführen der Oligos in die Zellen ohne Vektorsysteme.

7.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht

Da sich mit der ODM spezifische Mutationen in Gensequenzen oder anderen DNA-Sequenzen einer Pflanze einfügen lassen, können folgende Veränderungen vorgenommen werden: Modifikation der Aminosäuresequenz eines Proteins, Ausschalten eines Gens (durch die Einführung von Stop-Codons oder Leserahmenverschiebungen) oder Veränderung der Expression eines Gens (durch Mutationen in der Promotorsequenz). Anders ausgedrückt: Mit der ODM lassen sich innerhalb der Pflanze unerwünschte Gene stilllegen, nützliche Gene aktivieren oder effizientere Proteine/Enzyme herstellen.

Die Anwendungsmöglichkeiten der ODM sind vergleichbar mit der klassischen Mutagenese, wobei die ODM den bedeutenden Vorteil bietet, Mutationen ortsspezifisch auslösen zu können. Im Vergleich zu klassischer Mutagenese treten bei der ODM auch weniger unbeabsichtigte Veränderungen im Erbgut auf (ACRE 2011, Lusser et al. 2011, COGEM 2010, Breyer et al. 2009).

Zu den Eigenschaften, die sich mit ODM in Pflanzen einbringen lassen könnten, gehören unter anderem: Herbizidtoleranz, Schädlings- und Krankheitsresistenz, Toleranz gegenüber abiotischem Stress, verlängerte Haltbarkeit sowie veränderte Stärke- und Ölzusammensetzung (Lusser et al. 2011, Breyer et al. 2009).

7.3 Stand der Entwicklung

Auch wenn bereits Ende der 1990er Jahre an Tabak und Mais gezeigt worden ist, dass die ODM bei Pflanzen möglich ist (Beetham et al. 1999, Zhu et al. 1999), finden sich in der Literatur erst wenige Veröffentlichungen über Anwendungen des Verfahrens an Kulturarten. Erprobt wurde ODM bisher bei Banane (Rice et al. 2000), Mais (Rice et al. 2000, Zhu et al. 2000/1999), Raps (Gocal et al. 2015, Ruiter et al. 2003, Gamper et al. 2000), Reis (Okuzaki & Toriyama 2004), Tabak (Kochovenko & Willmitzer 2003) und Weizen (Dong et al. 2006).

In Nordamerika haben die Anwendungen von ODM zu einem ersten kommerziellen Produkt geführt. In den USA ist seit 2015 der Raps 5715 der Firma Cibus erhältlich, der gegenüber Sulfonylharnstoff-haltigen Herbiziden tolerant ist. Ab 2017 soll der Raps in Kanada vermarktet werden (Cibus 2015). Zudem ist eine Marktlancierung in Europa geplant (Wolt et al. 2015).

Die Firma Cibus plant bis Ende 2020 weitere ODM-Sorten auf den Markt zu bringen: eine Phytophthora-resistente Kartoffel sowie Herbizid-tolerante Sorten von Flachs und Reis (Cibus 2015).

8. T-DNA-vermittelte Mutagenese

Die T-DNA-vermittelte Mutagenese ist ein Verfahren zur gezielten Mutagenese von Pflanzen (Endo & Toki 2013). Erfolgt das Verfahren ohne exogene positive Selektionsmarker, wird es als «saubere» Transformationstechnik bezeichnet, die zu Pflanzen führt, welche vergleichbar mit Pflanzen aus der herkömmlichen Mutationszüchtung sind (Saika & Toki 2011).

8.1 Beschreibung des Verfahrens

Mit dem Verfahren lassen sich an einer vorbestimmten Sequenz des Erbguts gezielt eine oder mehrere Nukleotide inserieren, deletieren oder austauschen (Endo & Toki 2013). Um die Mutationen zu erzeugen, wird als erstes eine DNA-Sequenz, die – abgesehen von den zu ändernden Nukleotiden – homolog zur Zielsequenz ist, in eine T-DNA kloniert. Der Vektor mit der T-DNA wird

dann in Agrobakterien gebracht und mit deren Hilfe in Pflanzenzellen eingeschleust, wo es schliesslich zur homologen Rekombination zwischen der eingeführten Sequenz und der endogenen Zielsequenz kommen kann (Saika et al. 2011, Endo et al. 2007). Die transformierten Zellen können zu Pflanzen regeneriert werden, wobei jene selektiert werden, die ausschliesslich homologe Rekombinationen aufweisen. Regenerierte Pflanzen, in denen neben der homologen Rekombination zusätzlich zufällige Insertionen der T-DNA und/oder unerwünschte ektopische Rekombinationen stattfanden, werden aussortiert.

Die gezielte Mutagenese mittels T-DNA ist vergleichbar mit dem NRE-2-Verfahren (Abschnitt 6.1.2). Im Unterschied zum NRE-2-Verfahren werden jedoch keine Nukleasen eingesetzt.

8.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht

Die T-DNA-vermittelte Mutagenese könnte in der Pflanzenzucht ähnliche Anwendungen möglich machen wie die ODM (Abschnitt 7) oder das NRE-2-Verfahren (Abschnitt 6.1.2).

8.3 Stand der Entwicklung

Berichte über erfolgreiche Anwendungen des Verfahrens gibt es bisher nur bei Reis (Endo et al. 2015b/2007, Saika et al. 2011, Saika & Toki 2011).

9. RNAi-induzierte CMS

Bei der RNAi-induzierten cytoplasmatischen-männlichen Sterilität (CMS) wird in Pflanzen mit gentechnischen Methoden die Expression des *msh1*-Gens unterdrückt, um im Erbgut der Mitochondrien Neuaneordnungen zu erzeugen, die zu einer CMS führen (Sandhu et al. 2007). Die resultierenden männlich-sterilen Pflanzen können frei von den während des Züchtungsprozesses extrazellulär eingeführten DNA-Sequenzen sein (Sandhu et al. 2007).

9.1 Beschreibung des Verfahrens

Wie beim DR-Verfahren (Abschnitt 11) wird in einem ersten Schritt eine gentechnisch veränderte Pflanze hergestellt, bei der die Expression des *msh1*-Gens durch RNAi unterdrückt ist. Da das MSH1-Protein für die Stabilität des mitochondrialen Genoms sorgt, führt die Stilllegung des *msh1*-Gens dazu, dass es in den Mitochondrien der gentechnisch veränderten Pflanze zu Neuaneordnungen des Genoms kommt. Diese Neuaneordnungen wiederum können dazu führen, dass die Pflanze männlich steril wird. Wird die gentechnisch veränderte Pflanze mit der unveränderten Ausgangspflanze gekreuzt, bleibt die induzierte CMS auch in den Nachkommen erhalten, die das RNAi-Konstrukt nicht mehr aufweisen (Sandhu et al. 2007).

9.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht

Das Verfahren ermöglicht die Herstellung neuer CMS-Linien, die bei der Erzeugung von Hybrid-saatgut eingesetzt werden können (Sandhu et al. 2007).

9.3 Stand der Entwicklung

Veröffentlichte Berichte zur Erzeugung von CMS-Linien durch RNAi-induzierte Stilllegung des *msh1*-Gens gibt es bisher bei Tabak und Tomate (Sandhu et al. 2007). Zudem soll die Herstellung von CMS-Linien auch bei Soja sowie Sorghum- und Millethirs gelungen sein (Arrieta-Montiel & Mackenzie 2011).

10. Transgen-gesteuerte Mutagenese

Die Transgen-gesteuerte Mutagenese beruht darauf, mittels gentechnischer Methoden das DNA-Korrektursystem von Pflanzenzellen zu stören, um dadurch Mutationen im Erbgut der Pflanzen zu erzeugen (van Marcke & Angenon 2013, Xu et al. 2012a, Chao et al. 2005). Da die gentechnische Veränderung im Endprodukt nicht mehr gebraucht wird, können Pflanzen entstehen, die frei von extrazellulär eingeführten DNA-Sequenzen sind (Xu et al. 2012a).

10.1 Beschreibung des Verfahrens

Bei der Transgen-gesteuerten Mutagenese werden Pflanzen mit Expressionskassetten oder RNAi-Konstrukten so gentechnisch verändert, dass ihr DNA-Mismatch-Reparatursystem nicht mehr richtig funktioniert. Indem das DNA-Korrektursystem gestört wird, entstehen im Erbgut der Pflanzen Punktmutationen (Substitutionen) in kodierenden Regionen sowie kurze Insertionen und Deletionen in Mikrosatelliten (Xu et al. 2012a). Diese genetischen Veränderungen werden stabil weitervererbt und können deshalb auch in den Nachkommen der gentechnisch veränderten Pflanzen vorhanden sein, welche die Expressionskassette beziehungsweise das RNAi-Konstrukt nicht mehr enthalten (Xu et al. 2012a).

10.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht

Die Anwendungsmöglichkeiten der Transgen-gesteuerten Mutagenese sind vergleichbar mit der konventionellen Mutagenese.

10.3 Stand der Entwicklung

Das Verfahren ist 2005 bei Arabidopsis (Chao et al. 2005) entwickelt und seither bei Reis (Xu et al. 2012a), Tabak (van Marcke & Angenon 2013) und Tomate (Tam et al. 2011) erprobt worden.

11. Developmental Reprogramming

Als *Developmental Reprogramming* (DR) wird hier ein Verfahren bezeichnet, das die RNAi-Technik nutzt, um in Pflanzen die Expression des *msh1*-Gens zu unterdrücken und damit epigenetische Veränderungen zu erzeugen, die zu einer Erhöhung des Ertrags führen können (Yang et al. 2015, Santamaria et al. 2014). Da die epigenetischen Veränderungen auch in Nachkommen ohne RNAi-Konstrukt erhalten bleiben können, lassen sich Pflanzen erzeugen, die frei von extrazellulär eingeführten DNA-Sequenzen sind (Yang et al. 2015, Santamaria et al. 2014).

11.1 Beschreibung des Verfahrens

Der erste Schritt des Verfahrens besteht darin, gentechnisch veränderte Pflanzen herzustellen, bei denen die Bildung des pflanzeigenen MSH1-Proteins durch RNAi unterdrückt ist. Diese Unterdrückung löst in den Chloroplasten der gentechnisch veränderten Pflanzen eine Reaktion aus, die zu epigenetischen Veränderungen des Kerngenoms und – damit verbunden – zu einem *developmental reprogramming* mit einer Reihe neuer phänotypischer Eigenschaften führt (Xu et al. 2012b). Diese neuen Eigenschaften bleiben auch in den Nachkommen der gentechnisch veränderten Pflanze erhalten, die das RNAi-Konstrukt nicht mehr aufweisen. Werden reprogrammierte Pflanzen ohne RNAi-Konstrukt mit unveränderten Ausgangspflanzen gekreuzt, können Nachkom-

men resultieren, die besser wachsen und höhere Erträge liefern (Virdi et al. 2015, Yang et al. 2015, Santamaria et al. 2014).

11.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht

Das DR-Verfahren könnte interessant für die Züchtung sein, weil es die Möglichkeit eröffnet, wie in der Hybridzüchtung Sorten zu entwickeln, die höhere Erträge liefern (Yang et al. 2015, Santamaria et al. 2014).

11.3 Stand der Entwicklung

Das DR-Verfahren wird gegenwärtig bei Soja, Tomate sowie Sorghum- und Millethirsen erprobt (Yang et al. 2015, Santamaria et al. 2014, Xu et al. 2012b, Mackenzie 2011).

12. RNAi-induzierte Hypomethylierung

Das Verfahren der RNAi-induzierten Hypomethylierung nutzt gentechnische Methoden, um in Pflanzen die Expression von DNA-Methyltransferasen oder anderen Regulatoren der DNA-Methylierung zu senken, und ermöglicht damit, epiallelische Variationen zu erzeugen (King et al. 2010). Epiallele sind Allele, die zwar in ihrer DNA-Sequenz übereinstimmen, aber unterschiedlich exprimiert sind. Da die gentechnische Veränderung im Endprodukt nicht mehr benötigt wird, können Pflanzen entstehen, die frei von extrazellulär eingeführter DNA sind.

12.1 Beschreibung des Verfahrens

Die RNAi-induzierte Hypomethylierung beruht auf der vorübergehenden Stilllegung von Genen, die für DNA-Methyltransferasen oder andere Regulatoren der DNA-Methylierung wie beispielsweise für den Chromatinremodellierungsfaktor DDM1 kodieren (King et al. 2010). Indem solche Gene in den Pflanzen stillgelegt werden, ändert sich an zufälligen Stellen des Erbguts das Methylierungsmuster. Da das veränderte Muster an die Nachkommen weitervererbt werden kann, lassen sich Phänotypen mit den gewünschten Epiallelen selektionieren.

Die Stilllegung der Gene erfolgt mit der RNAi-Technik und kann via stabile Transformation oder VIGS erreicht werden. Wird die Strategie der stabilen Transformation angewendet, können via Segregation Pflanzen hergestellt werden, die das eingeführte RNAi-Konstrukt nicht mehr besitzen. Falls VIGS zur Anwendung kommt, können Nachkommen ohne RNAi-Konstrukt entstehen, wenn ein viraler Vektor eingesetzt wird, der nicht via Samen übertragen wird (Abschnitt 21).

12.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht

Mit der RNAi-induzierten Hypomethylierung können in ausgewählten Pflanzen Epiallele erzeugt werden. Da die epiallelische Variation die phänotypische Vielfalt und somit auch die Leistung von Pflanzen beeinflusst, könnte das Verfahren für die Pflanzenzüchtung interessant sein.

12.3 Stand der Entwicklung

Dass sich in Pflanzen epigenetische Variation mittels RNAi-induzierter Hypomethylierung erzeugen lässt, ist bei Rübsen (Fujimoto et al. 2008), Reis (Higo et al. 2012) und Pappeln (Zhu et al. 2013) gezeigt worden.

13. RNA-dirigierte DNA-Methylierung (RdDM)

Als RNA-dirigierte DNA-Methylierung (RdDM) wird ein Pflanzenzüchtungsverfahren bezeichnet, bei dem gentechnische Methoden eingesetzt werden, um bestimmte genomische Sequenzabschnitte gezielt zu methylieren und damit die Expression endogener Gene zu modifizieren. Da die gentechnischen Methoden allein für die Auslösung der Methylierung notwendig sind, nicht aber zwingend für den Erhalt des neuen Methylierungsmusters, können sich mit RdDM Pflanzen entwickeln lassen, die frei von extrazellulär eingeführten DNA-Sequenzen sind (Kasai & Harada 2015, Kasai & Kanazawa 2013, Lusser et al. 2012/2011, Kanazawa et al. 2011a/b, Wassenegger et al. 2010, COGEM 2006).

13.1 Beschreibung des Verfahrens

Das RdDM-Verfahren beruht, wie es der Name bereits beinhaltet, auf dem in Pflanzen vorkommenden Prozess der RNA-dirigierten DNA-Methylierung. Bei diesem Prozess werden aus doppelsträngiger RNA (dsRNA) so genannte *small interfering RNAs* (siRNA) gebildet, welche zur *de novo* Methylierung von Cytosinen führen und zwar in DNA-Regionen, die homolog zu den dsRNAs beziehungsweise siRNAs sind (Matzke et al. 2007). Erfolgt die *de novo* Methylierung innerhalb von Promotor-Sequenzen, kann dies zum transkriptionellen Gen-Silencing (TGS) und damit zur teilweisen oder vollständigen Inaktivierung des korrespondierenden Gens führen (Eamens et al. 2008, Matzke et al. 2007). Findet die Methylierung innerhalb einer Sequenz eines Silencers statt, kann dies eine transkriptionelle Aktivierung, also eine gesteigerte Expression des korrespondierenden Gens bewirken (Shibuya et al. 2009). Die auf diesen Wegen *de novo* erzeugten Methylierungen können meiotisch stabil sein und deshalb an Nachkommen weitervererbt werden.

Da es mit Hilfe gentechnischer Methoden möglich ist, den pflanzeigenen Mechanismus der DNA-Methylierung auszulösen und zu lenken, kann der oben beschriebene RdDM-Prozess zur Züchtung neuer, epigenetisch modifizierter Pflanzen ausgenutzt werden. Um beim RdDM-Verfahren die DNA-Methylierung auszulösen, werden gegenwärtig vier verschiedene gentechnische Strategien erprobt und/oder diskutiert: Transformation, transiente Transfektion, VIGS und Pflöpfen mit gentechnisch verändertem Reiser beziehungsweise Wurzelstock (Kasai & Harada 2015, Kasai & Kanazawa 2013, Vogel 2012).

13.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht

Durch das RdDM-Verfahren können in ausgewählten Pflanzen so genannte Epiallele erzeugt werden – das sind Allele, die zwar in ihrer DNA-Sequenz übereinstimmen, aber unterschiedlich exprimiert sind. Da die epigenetische Vielfalt die phänotypische Vielfalt und somit auch die Leistung von Pflanzen beeinflusst, ist RdDM für die Pflanzenzüchtung interessant. Das gilt insbesondere für Kulturpflanzenarten, die eine schmale genetische Basis haben.

Das Verfahren kann bei allen Kulturpflanzenarten eingesetzt werden, bei denen gentechnische Methoden etabliert sind, die das Einbringen von dsRNA in die Zellen ermöglichen (Lusser et al. 2011). Die Kombination des RdDM-Verfahrens mit dem Pflöpfen könnte vor allem in der Züchtung neuer Frucht- oder Obstsorten von Interesse sein (Bai et al. 2011).

13.3 Stand der Entwicklung

Das Konzept, mittels RdDM transgenfreie epigenetisch modifizierte Pflanzen zu züchten, ist um die Jahrtausendwende entwickelt worden (Wang & Waterhouse 2001). Seither ist die Stilllegung endogener Pflanzengene mittels RdDM bei folgenden Kulturarten beschrieben worden: Petunien (Kon & Yoshikawa 2014, Kanazawa et al. 2011a/b, Sijen et al. 2001), Mais (Cigan et al. 2005), Kartoffel

(Heilersig et al. 2006), Reis (Okano et al. 2008), Karotte (Shibukawa et al. 2009) und Tomate (Kanazwa et al. 2011a). Dass die Stilllegung dabei auch ohne den Auslöser stabil weitervererbt werden kann, ist bisher bei Petunie, Reis und Tomate gezeigt worden (Kasai & Kanazawa 2013).

14. Agroinfiltration

Agroinfiltration ist ein Verfahren, das rekombinante Agrobakterien dazu nutzt, in Geweben von Pflanzen eine vorübergehende Expression genetischer Konstrukte zu erreichen. Die Integration der Konstrukte in Keimzellen wird nicht beabsichtigt. Das Verfahren kommt hauptsächlich in der Grundlagenforschung zum Einsatz, kann aber auch in Züchtungsprogrammen genutzt werden (Lusser et al. 2011, Schaart & Visser 2009). Da Stecklinge und Samen infiltrierter Pflanzen weiterverwendet werden können, stellt sich die Frage, wie diese zu regulieren sind (COGEM 2006).

Falls bei der Agroinfiltration rekombinante Agrobakterien verwendet werden, die virale Vektoren enthalten, wird das Verfahren Agroinfektion (Grimsley et al. 1986) oder Agroinokulation (Elmer et al. 1988) genannt. Agroinfektion und Agroinokulation können auch dem Virus-induzierten Gen-Silencing (VIGS; Abschnitt 21) oder der Virus-unterstützten Genexpression (VUGE; Abschnitt 22) zugeordnet werden.

Das *floral dip*-Verfahren, bei dem die Blüten einer Pflanze in eine Agrobakteriensuspension getaucht werden, kann ebenfalls der Agroinfiltration zugerechnet werden (Lusser et al. 2011). Das Verfahren wird hier jedoch nicht behandelt, weil es zu stabil transformierten, gentechnisch veränderten Pflanzen und damit zu GVO-Produkten führt.



Abbildung 5: Agroinfiltration von Blättern von *Nicotiana benthamiana*. Quelle: Chandres, Wikimedia.

14.1 Beschreibung des Verfahrens

Bei der Agroinfiltration wird das Gewebe einer Pflanze, meistens sind es Blätter, mit einer flüssigen Suspension von rekombinanten Agrobakterien infiltriert. Die Infiltration kann mit Hilfe von Spritzen (Abbildung 5) oder Zahnstochern sowie durch das Anlegen eines Vakuums erfolgen. Falls Wurzeln das Zielgewebe sind, kann die Infiltration auch durch blosses Eintauchen in eine Agrobakteriensuspension gelingen (Agrodrench-Verfahren; Ryu et al. 2004).

Sind die rekombinanten Agrobakterien in den Pflanzenzellen, wird ihre T-DNA in den Zellkern transportiert, wo es zur vorübergehenden Expression der rekombinanten Gene kommt. Die Gene auf der T-DNA können dabei als freie DNA-Moleküle aktiv werden; sie müssen somit nicht in das Erbgut der Pflanzenzellen integriert sein, um exprimiert zu werden (Schaart & Visser 2009).

Je nach Genkonstrukt, das via rekombinante Agrobakterien in das Pflanzengewebe infiltriert wird, können zwei Typen von Agroinfiltration unterschieden werden (Lusser et al. 2011):

1. «Agroinfiltration im eigentlichen Sinne»: Die Infiltration erfolgt mit Agrobakterien, die nicht-replikative Genkonstrukte enthalten. Die Expression der eingeführten Gene ist lokal beschränkt auf den Bereich der Pflanze, der infiltriert worden ist. Je nach Design der nicht-replikativen Genkonstrukte, kann es dabei zur Bildung eines Proteins oder zur Stilllegung eines endogenen Gens kommen. Falls Gene vorübergehend stillgelegt werden sollen, können die Genkonstrukte so designt werden, dass sie einen *inverted repeat* enthalten (IR-Konstrukte). Diese sorgen in der Zelle für die Produktion von doppelsträngiger DNA, die via RNA-Interferenz (RNAi) zur Stilllegung von Genen führen (Schaart & Visser 2009).
2. «Agroinokulation» oder «Agroinfektion»: Die Infiltration erfolgt mit Agrobakterien, die replikative Genkonstrukte enthalten. Die einzuführenden Gene werden dazu erst in einen viralen Vektor eingebaut, der dann wiederum in die T-DNA integriert wird. Da der virale Vektor innerhalb der Zellen repliziert und sich verbreitet, erfolgt die Expression der Gene in der ganzen Pflanze. Je nach Design des replikativen Genkonstruktes kann es dabei zur Bildung eines Proteins oder zur Stilllegung eines endogenen Genes kommen. Ersterer Fall kann auch dem VUGE (Abschnitt 22), letzterer Fall dem VIGS (Abschnitt 21) zugerechnet werden.

14.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht

In der Pflanzenzüchtung sind unterschiedliche Anwendungen der Agroinfiltration möglich. So kann das Verfahren ein interessantes Werkzeug sein, um Pflanzen auf mögliche Krankheitsresistenzen zu testen (Lusser et al. 2011, Schaart & Visser 2009). In diesen Fällen dient die Agroinfiltration der Selektion von Pflanzen, die für die weitere Züchtung verwendet werden können. Bei der Züchtung gentechnisch veränderter Pflanzen wiederum kann die Agroinfiltration dazu benutzt werden, mögliche Transgene vor einer stabilen Transformation im Pflanzengewebe zu testen (Leckie & Stewart 2011).

Die Agroinfiltration (insb. Agroinokulation/Agroinfektion) wird seit neuem auch als mögliches Werkzeug diskutiert für die RNA-dirigierte DNA-Methylierung (Abschnitt 13), das *Reverse Breeding* (Abschnitt 18), die Blühverfrühungs-Technik (Abschnitt 15) sowie die NRE-Technik (Abschnitt 6). Neben der Pflanzenzüchtung kommt die Agroinfiltration auch in der Grundlagenforschung und beim *Molecular Farming* zum Einsatz. In der Grundlagenforschung wird die Agroinfiltration als Werkzeug der funktionalen Genomik oder zum Studium der Interaktionen zwischen Pflanze und Pathogenen eingesetzt (Lusser et al. 2011). Beim *Molecular Farming* wiederum wird die Agroinfiltration zur Herstellung von biopharmazeutischen Proteinen erprobt (Krenek et al. 2015).

14.3 Stand der Entwicklung

Agroinfiltration wird seit den 1980er Jahre in der Forschung eingesetzt. In der Literatur lassen sich über 300 Publikationen zu entsprechenden Forschungsarbeiten finden (Lusser et al. 2011). In der Mehrheit der Fälle beschreiben die Publikationen Anwendungen in der Grundlagenforschung (Lusser et al. 2011). Was andere mögliche Anwendungen betrifft, so lassen sich in der Literatur Beispiele finden, in denen Agroinfiltration zur Herstellung rekombinanter Proteine (Krenek et al.

2015) oder zur Selektion von krankheitsresistenten Pflanzen eingesetzt wird (z.B. Krenek et al. 2015, Vleeshouwers et al. 2008, Zenna et al. 2006).

15. Blühverfrühungs-Technik

Die Blühverfrühungs-Technik ist ein Verfahren zur Generationsbeschleunigung. Gentechnische Methoden kommen zum Einsatz, um die Jugendphase von Pflanzen zu verkürzen, wodurch sich der Züchtungsprozess beschleunigen lässt (Schaart et al. 2015, Schaart & Visser 2009). Da die gentechnische Veränderung im Endprodukt nicht mehr gebraucht wird, können Pflanzen entstehen, die frei von extrazellulär eingeführter DNA sind (van Nocker & Gardiner 2014, Le Roux et al. 2012, Schaart & Visser 2009).

Das Verfahren wird auch als FastTrack-Züchtungssystem (Waltz 2012), High-Speed-Züchtungstechnik (Flachowsky et al. 2011) oder Beschleunigte Züchtung (Schaart & Visser 2009) bezeichnet.

15.1 Beschreibung des Verfahrens

Das Verfahren der Blühverfrühung kombiniert gentechnische Methoden mit der herkömmlichen Methode des Kreuzens zweier verschiedener Elterpflanzen. Die gentechnischen Methoden werden dabei dazu genutzt, in einer ausgewählten Pflanze eine frühzeitige Blüte zu induzieren. Die früh blühende Pflanze wird dann mit einer anderen Pflanze gekreuzt.

Die bei der Blühverfrühungs-Technik einkreuzbaren Gene können zumindest theoretisch sowohl aus dem primären und sekundären als auch tertiären Genpool einer Sorte stammen. So können nicht nur bestehende Sorten, Landsorten oder sexuell kompatible Wildarten als Genquelle wirken, sondern auch nicht sexuell kompatible Arten. Letzteres ist auf zwei Wegen möglich: Erstens indem vor dem Start des Verfahrens die gewünschten Gene aus einer nicht kreuzbaren Art via Brückenkreuzung in eine sexuell kompatible Art eingekreuzt werden. Zweitens indem vor dem Start der Blühverfrühungs-Technik Gene aus dem tertiären Genpool via *embryo rescue*-Verfahren in den primären Genpool transferiert werden.

Die Auslösung der Blühverfrühung kann entweder durch die Expression von gentechnisch eingefügten «Blüh-Induktions-Genen» (z.B. BpMADS4) oder durch die Stilllegung endogener Gene (z.B. TFL1) mittels der RNAi-Technik (Schaart & Visser 2009) erfolgen. Um die Expression beziehungsweise Stilllegung dieser Gene zu erreichen, werden gegenwärtig vier verschiedene gentechnische Strategien erprobt oder diskutiert (Schaart et al. 2015, van Nocker & Gardiner 2014, Vogel 2012): Transformation, VIGS (Abschnitt 21), VUGE (Abschnitt 22) und Pfropfen mit gentechnisch veränderten Wurzelstöcken (Abschnitt 4.2). In Abbildung 6 ist ein vereinfachtes Schema der Blühverfrühungs-Technik dargestellt für den Fall, bei dem die Blühverfrühung mittels Transformation ausgelöst wird.

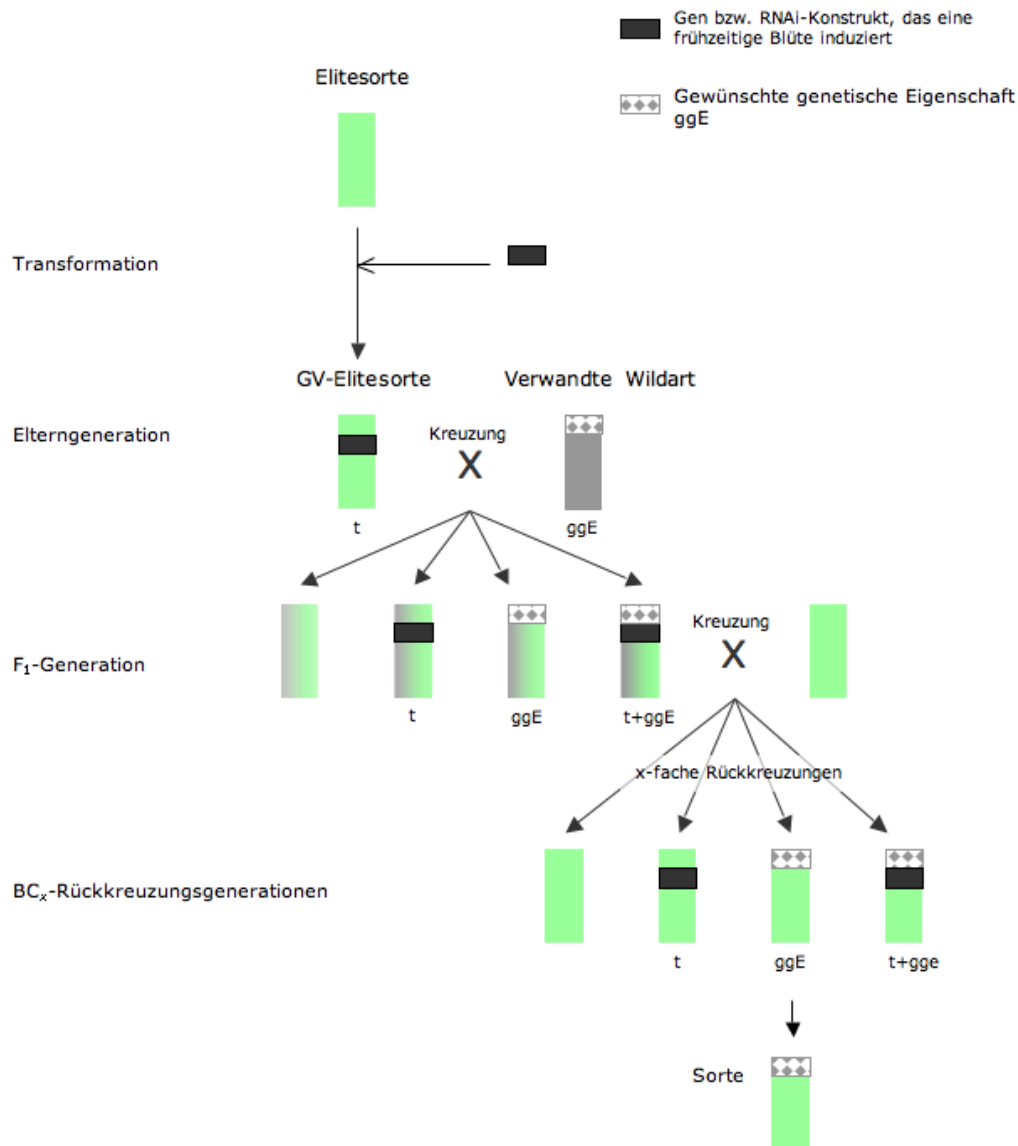


Abbildung 6: Vereinfachtes Schema der Blühverfrühungs-Technik für den Fall, bei dem die Blühverfrühung mittels Transformation ausgelöst wird (nach Flachowsky et al. 2009). Das Züchtungsschema besteht im Wesentlichen aus folgenden Schritten: (1) Die Elitesorte, in welche die gewünschten genetischen Eigenschaften eingekreuzt werden sollen, werden gentechnisch so verändert, dass sie früh zur Blüte kommen. (2) Die gentechnisch veränderte Pflanze wird mit der Pflanze gekreuzt, welche die gewünschten Eigenschaften enthält. (3) Von den Nachkommen der Kreuzung (F₁-Generation) werden diejenigen Individuen zur Weiterzucht ausgeselen, die sowohl die gentechnisch eingefügten Gene als auch die gewünschten genetischen Eigenschaften enthalten. (4) Die selektierten F₁-Pflanzen werden mit der unveränderten Elitesorte rückgekreuzt. (5) Von den Nachkommen der (Pseudo)-Rückkreuzung (backcross generation, BC) werden wiederum diejenigen zur Weiterzucht ausgeselen, die sowohl die gentechnisch eingefügten Gene als auch die gewünschten Eigenschaften enthalten. (6) Die (Pseudo)-Rückkreuzung wird so oft wiederholt, bis die unerwünschten genetischen Eigenschaften, die durch die Kreuzung mit in das Erbgut eingebracht worden sind, entfernt sind. (8) Im letzten Schritt werden die Pflanzen selektiert, welche die gewünschten genetischen Eigenschaften besitzen, nicht aber die gentechnisch eingefügten Gene.

15.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht

Die Blühverfrühungs-Technik ist insbesondere für die Züchtung neuer Obst- und Forstbaumsorten von Interesse. Im Vergleich zur Sortenzüchtung bei einjährigen Pflanzen dauert die Erzeugung

neuer Sorten bei Bäumen sehr lange. Da Obst- und Forstbäume lange brauchen, um zur ersten Blüte kommen, können bestimmte Eigenschaften mit der klassischen Kreuzungszüchtung erst nach vielen Jahrzehnten oder gar nicht in neuen Sorten realisiert werden (Flachowsky et al. 2011, Fladung 2011). Um beispielsweise eine neue Apfelsorte zu züchten, die genetische Eigenschaften von Wildäpfeln aufweisen soll, können mehr als 50 Jahre Züchtungsarbeit notwendig sein (Flachowsky et al. 2011). Indem die Blühverfrühungs-Technik die vegetative Phase der Bäume auf wenige Monate verkürzt, beschleunigt sie den Züchtungsprozess.

Neben dem Einsatz bei der Züchtung neuer Obst- und Forstbaumsorten wird die Blühverfrühungs-Technik auch bei einjährigen Pflanzen verwendet, um den Züchtungsprozess abzukürzen (Yamagishi & Yoshikawa 2011a/b).

15.3 Stand der Entwicklung

1995 ist an Aspen erstmals gezeigt worden, dass sich mittels gentechnischer Methoden die Jugendphase von Bäumen verkürzen lässt. Seither ist das Verfahren stetig verfeinert, weiter entwickelt und an mehreren Baumarten erprobt worden. Zu diesen Baumarten gehören Apfel (Weigl et al. 2015, Kishigami et al. 2014, Yamagishi et al. 2014/2011, Wenzel et al. 2013, Le Roux et al. 2012, Flachowsky et al. 2011/2007/2006, Tränkner et al. 2010, Zhu et al. 2009), Aspen (Weigel & Nilsson 1995), Birne (Freiman et al. 2012, Matsuda et al. 2006), Bitterorange (Endo et al. 2005), Eukalypten (Klocko et al. 2015), Kartoffel-Rose (Xing et al. 2014b), Olive (Cerezo et al. 2014), Pappel (Hoenicka et al. 2014, Tränkner et al. 2010, Zhang et al. 2010, Böhlenius et al. 2006, Hsu et al. 2006), Pflaume (Srinivasan et al. 2012), Kumquat (Duan et al. 2010) und Zitrusbäume (Cervera et al. 2009, Pena et al. 2001). Freisetzungsversuche mit früh blühenden Bäumen sind bei Apfel und Pflaume in den USA (ISB 2015, Scorza et al. 2014) sowie bei Citrange und Orange in Spanien (JRC 2015) durchgeführt worden.

Forschungsprojekte bei einjährigen Pflanzen gibt es bei Baumwolle (McGarry & Kragler 2013, McGarry & Ayre 2012), Soja (Yamagishi & Yoshikawa 2011a/b) und Tabak (Lewis & Kernodle 2009).

16. Markergen-unterstützte Haploidenzüchtung

Als Markergen-unterstützte Haploidenzüchtung wird hier ein Verfahren bezeichnet, das die Erzeugung von haploiden Pflanzen erleichtert, indem bestehende Haploiden-Induktionslinien mit einem visuell selektierbaren Markergen transformiert werden. Da das Markergen in den resultierenden Haploiden nicht mehr vorhanden ist, können aus dem Verfahren Pflanzen hervorgehen, die frei von extrazellulär eingeführten DNA-Sequenzen sind.

16.1 Beschreibung des Verfahrens

Das Verfahren kombiniert die In-vivo-Haploideninduktion mit der Gentechnik. Die In-vivo-Haploideninduktion beruht auf dem Einsatz so genannter Induktionslinien; das sind Pflanzen, die – als Bestäuber verwendet – haploide Nachkommen entstehen lassen. Ein entscheidender und arbeitsaufwendiger Schritt des Verfahrens besteht darin, haploide von diploiden Nachkommen zu unterscheiden. Um diesen Schritt zu vereinfachen, können Induktionslinien mit einem Gen transformiert werden, das für das grün fluoreszierende Protein (GFP) kodiert. Die Unterscheidung der Nachkommen wird mit dem Einsatz solcher GFP-Induktionslinien erleichtert, weil nur diploide Nachkommen das GFP bilden. Da die haploiden Nachkommen das Gen für das GFP nicht aufwei-

sen, können aus dem Verfahren Pflanzen hervorgehen, die frei von extrazellulär eingeführten DNA-Sequenzen sein (Yu & Birchler 2015, Palumbo 2003).

16.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht

Das Verfahren kann bei denjenigen Kulturarten zur Herstellung von Haploiden eingesetzt werden, bei denen Haploideninduktionslinien existieren.

16.3 Stand der Entwicklung

Berichte über die Anwendung des Verfahrens gibt es bei Kartoffel (Palumbo 2003), Mais (Yu & Birchler 2015) und Tabak (Hancock et al. 2015).

17. Markergen-unterstützte Kreuzungszüchtung

Als Markergen-unterstützte Kreuzungszüchtung wird hier ein Verfahren bezeichnet, das die Kreuzung von Pflanzen unterschiedlicher Arten oder Gattungen erleichtert, indem einer der Kreuzungspartner mit einem selektierbarem Markergen ausgestattet wird (Heffelfinger et al. 2015, Kausch et al. 2013). Da das Markergen nur während des Züchtungsprozesses gebraucht wird, können die resultierenden Pflanzen frei von rekombinanter DNA sein (Heffelfinger et al. 2015, Kausch et al. 2013).

Eine Variante des Verfahrens wird auch *In-situ*-Embryonenrettung genannt (Hague et al. 2014, Tilelli et al. 2012).

17.1 Beschreibung des Verfahrens

Das Kreuzen von Pflanzenindividuen, die unterschiedlichen Arten oder Gattungen angehören, ist ein seit längerem praktiziertes Vorgehen, um neues Zuchtmaterial zu gewinnen. Dieses – Weite Kreuzungen genannte – Verfahren ist sehr arbeits- und zeitaufwendig, weil es schwierig ist, hybride Nachkommen zu selektionieren und/oder die Embryonenrettungs-Technik (*embryo rescue technique*) angewendet werden muss. Eine Möglichkeit, Weite Kreuzungen zu erleichtern, bietet die Markergen-unterstützte Kreuzung. Sie beruht darauf, dass eine der zu kreuzenden Pflanzen gentechnisch mit einem selektierbaren Markergen – zum Beispiel einem Gen für Herbizidtoleranz – ausgestattet wird. Damit wird es möglich, hybride Kreuzungsnachkommen zu selektionieren und/oder die Embryonenrettung zu vereinfachen, weil unreife Embryonen direkt zusammen mit ihrem Nährgewebe in Kultur genommen werden können (Kausch et al. 2013). Hybride Nachkommen, die fertil sind, können dann mit der gentechnisch nicht veränderten Elternpflanze rückgekreuzt werden, wodurch sich das transgene Markergen segregieren lässt (Kausch et al. 2013).

17.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht

Die Markergen-unterstützte Kreuzung vereinfacht Weite Kreuzungen und erleichtert es damit, Gene aus nur schwer kreuzbaren Arten in eine Kulturart zu übertragen. Das Verfahren ist für die Pflanzenzüchtung dann interessant, wenn die genetische Variation innerhalb einer Kulturart nicht ausreicht, um züchterische Verbesserungen zu erzielen.

17.3 Stand der Entwicklung

Die Markergen-unterstützte Kreuzung wird gegenwärtig bei der Rutenhirse angewendet (Heffelfinger et al. 2015, Hague et al. 2014, Kausch et al. 2013, Tilelli et al. 2012). Ob das Verfahren auch bei anderen Kulturarten erprobt wird, ist nicht bekannt.

18. Reverse Breeding (RB)

Reverse breeding (RB) ist ein Züchtungsverfahren, das gentechnische Methoden nutzt, um die meiotische Rekombination zu unterdrücken, und damit die Züchtung von F1-Hybriden erleichtert (Dirks et al. 2009). Da die gentechnische Veränderung im Endprodukt nicht mehr gebraucht wird, können aus dem Reverse Breeding Pflanzen hervorgehen, die frei von extrazellulär eingeführten DNA-Sequenzen sind (Lusser & Davies 2013, Lusser et al. 2012/2011, Chan 2010, Dirks et al. 2009, Wijnker & de Jong 2008).

18.1 Beschreibung des Verfahrens

Das RB-Verfahren besteht aus einer Kombination aus gentechnischen Methoden, Techniken zur Herstellung doppelhaploider Pflanzen (DH-Technik), Gewebekulturtechniken und herkömmlichen Kreuzungsverfahren.

Die gentechnischen Methoden werden dazu benutzt, um bei einer ausgewählten heterozygoten Pflanze die meiotische Rekombination zu unterdrücken. Erreicht werden kann dies, indem die Expression von solchen pflanzeigenen Genen stillgelegt wird, die am meiotischen Rekombinationsprozess beteiligt sind (Schaart & Visser 2009, COGEM 2006). Für die Stilllegung dieser Gene stehen drei gentechnische Strategien zur Diskussion (Vogel 2012, Dirks et al. 2009): Transformation, VIGS (Abschnitt 21) und Pfropfen mit gentechnisch veränderten Wurzelstöcken (Abschnitt 4.2). In Abbildung 7 sind die wichtigsten Züchtungsschritte dargestellt für den Fall, dass die meiotische Rekombination via Transformation unterdrückt wird.

18.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht

In der Literatur werden vor allem zwei mögliche Anwendungen des *Reverse Breeding* diskutiert: Herstellung von F1-Hybriden für die Landwirtschaft und Erzeugung von Chromosomen-Substitutionslinien für die weitere Züchtung (Lusser et al. 2011, Chan 2010, Dirks et al. 2009, Wijnker & de Jong 2008, Forster et al. 2007). Diese Anwendungen sind bei Pflanzenarten möglich, die nicht mehr als 12 Chromosomen haben und bei denen die DH-Technik angewendet werden kann (Lusser et al. 2011, Dirks et al. 2009).

Die wichtigste Anwendung des RB-Verfahrens besteht in der Erhaltung von Elite-Genotypen beziehungsweise der Herstellung von F1-Hybriden. Da sich mit dem *Reverse Breeding* für jede beliebige heterozygote Pflanze die homozygoten Eltern erzeugen lassen, wird es möglich, auch uncharakterisierte heterozygote Genotypen mit Eliteeigenschaften zu erhalten. Mit herkömmlichen Züchtungsmethoden ist dies kaum zu erreichen (Dirks et al. 2009, Wijnker & de Jong 2008). Das *Reverse Breeding* erleichtert und beschleunigt die Züchtung von F1-Hybriden (Schaart & Visser 2009).

Neben der Herstellung von F1-Hybriden kann das *Reverse Breeding* auch dazu benutzt werden, Chromosomen-Substitutionslinien zu erzeugen. Diese Linien enthalten ein oder mehrere Chromosomen eines Elternteils im genetischen Hintergrund des anderen Elternteils. Durch Rückkreuzung können so beispielsweise Hybride entstehen, die für alle ausser einem Chromosom heterozygot sind beziehungsweise die für alle ausser einem Chromosomen homozygot sind (Dirks et al. 2009). Chromosomen-Substitutionslinien können für die Zuordnung von Eigenschaften sowie die Verbesserung der Elternlinien genutzt werden (Lusser et al. 2011, Chan 2010, Wijnker & de Jong 2008).

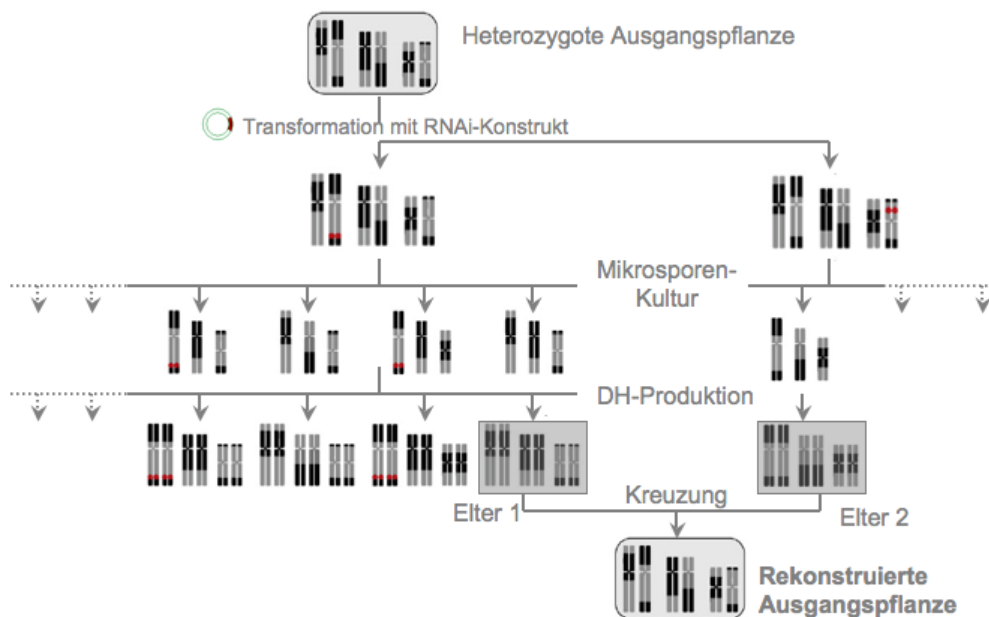


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Reverse Breeding nach Wjinker & de Jong (2008). Die fiktive Ausgangspflanze ist ein F1-Hybrid mit drei Chromosomenpaaren ($2n=2x=6$). Die meiotische Rekombination wird unterdrückt, indem der F1-Hybrid mit einem RNAi-Konstrukt transformiert wird. Das RNAi-Konstrukt führt zur Stilllegung eines der Gene, das für das Crossing-over benötigt wird. Die roten Punkte repräsentieren die eingeführten RNAi-Konstrukte. Die achiasmatische Meiose führt zu Sporen, die nicht rekombinante Chromosomen besitzen. Die meisten der entstehenden Sporen sind unausgeglichen (nicht gezeigt), einige der Sporen sind ausgeglichen (mehrere Möglichkeiten sind dargestellt). Aus den ausgeglichenen Sporen werden doppelhaploide Pflanzen produziert. Unter den doppelhaploiden Pflanzen können diejenigen reziproken Genotypen (Elter 1 und Elter 2) ausgesucht werden, die das RNAi-Konstrukt nicht mehr besitzen und nach Kreuzung den ursprünglichen F1-Hybrid ergeben. Elter 1 und Elter 2 stammen von zwei unterschiedlichen Primärtransformanten ab, die das RNAi-Konstrukt in verschiedenen Chromosomen aufweisen. Bildquelle: Wjinker & de Jong (2008).

18.3 Stand der Entwicklung

Das Konzept für das *Reverse Breeding* ist im Jahr 2001 beschrieben (Dirks et al. 2001) und die Machbarkeit 2012 an *Arabidopsis* gezeigt worden (Wjinker et al. 2012). In der Literatur werden mögliche Anwendungen des Verfahrens diskutiert (Barabaschi et al. 2016, Crismani et al. 2013, McGarry & Kragler 2013, Chan 2010, Dirks et al. 2009, Wjinker & de Jong 2008, Forster et al. 2007), konkrete Anwendungsbeispiele an Kulturpflanzen finden sich gegenwärtig jedoch nicht.

19. Seed Production Technology

Die *Seed Production Technology* (SPT) ist ein Prozess, bei dem gentechnisch veränderte Erhaltungslinien genutzt werden, um männlich-sterile Mutterlinien zu vermehren, die in der Produktion von Hybridsaatgut eingesetzt werden können (Wu et al. 2015, Whitford et al. 2013, FSANZ 2013, Shenoy & Sharma 2012). Im Endprodukt, dem Hybridsaatgut, sind die gentechnischen Veränderungen der Erhaltungslinie nicht mehr enthalten (Wu et al. 2015). Da die SPT keine Entfaltung der Mutterlinien bedarf, lassen sich bei der Herstellung von Hybridsaatgut höhere Erträge und bessere Qualitäten erzielen.

19.1 Beschreibung des Verfahrens

Die SPT beruht auf dem Einsatz zweier unterschiedlicher Inzuchtlinien: einer männlich sterilen Mutterlinie und einer gentechnisch veränderten Erhaltungslinie, die denselben genetischen Hin-

tergrund hat wie die Mutterlinie. Die männlich-sterile Mutterlinie wirkt bei der Produktion von Hybridsaatgut als weiblicher Elter. Da sie männlich-steril ist, kann sie sich nicht selber befruchten, weshalb die normalerweise bei der Hybridsamenproduktion notwendige Entfahnung entfällt. Um die männlich-sterile Mutterlinie selbst vermehren zu können, wird die gentechnisch veränderte Erhaltungslinie eingesetzt. Diese Linie enthält ein Konstrukt aus drei Genen: (I) ein Gen für ein männliches Fertilitätsprotein, das in den Antheren exprimiert ist; (II) ein Alpha-Amylase-Gen, das in den Pollenkörnern aktiv ist; sowie (III) ein in den Samen aktives *dsRed*-Gen. Anders als die männlich-sterile Mutterlinie kann die Erhaltungslinie Pollen bilden. Die Hälfte der gebildeten Pollen enthält das eingeführte Genkonstrukt und ist unfruchtbar. Die andere Hälfte der Pollen enthält das Genkonstrukt nicht und ist fruchtbar.

Der Prozess der SPT besteht hauptsächlich aus drei Schritten: 1. Vermehrung der Erhaltungslinie, 2. Vermehrung der männlich-sterilen Mutterlinie, 3. Produktion des Hybridsaatguts, das in den Verkauf gelangt.

Bei der Vermehrung der Erhaltungslinie wird diese mit sich selbst befruchtet. Die resultierenden Samen sind entweder rot oder gelb, wobei nur die roten Samen das eingeführte Genkonstrukt enthalten und für die Vermehrung der männlich-sterilen Mutterlinie ausgewählt werden. Die Sortierung der roten und gelben Samen erfolgt dabei maschinell. Bei der Vermehrung der Mutterlinie sorgen dann die nicht-transgenen Pollen der gentechnisch veränderten Erhaltungslinie für die Bestäubung. Die im Vermehrungsfeld gebildeten Samen können wiederum maschinell nach gelben und roten Samen sortiert werden. Die gelben, nicht-transgenen Samen werden schliesslich zusammen mit Samen einer männlich-fertilen Elite-Inzuchtlinie in einem Vermehrungsfeld ausgesät. Die Ernte dieses Feldes besteht aus den Samen, die als Hybridsaatgut in den Verkauf gelangen.

Die Angaben zur Beschreibung der SPT stammen aus USDA (2011) und Waltz (2012).

19.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht

Die SPT ist kein eigentliches Züchtungsverfahren, sondern ein Prozess, der die Produktion von Hybridsaatgut effizienter macht. Die Effizienz wird gesteigert, weil die bei der Herstellung von Hybridsaatgut oft notwendige Entfahnung der Mutterlinie wegfällt. Auch wenn die SPT ursprünglich für die Herstellung von Hybridsaatgut bei Mais entwickelt worden ist, ist ihre Anwendung bei anderen Kulturarten ebenfalls möglich (Wu et al. 2015, FSANZ 2013).

19.3 Stand der Entwicklung

In den USA kann die SPT bei der Herstellung von kommerziellem Hybridmaissaatgut eingesetzt werden. Das US-Landwirtschaftsministerium hat 2011 die gentechnisch veränderte Erhaltungslinie DP-32138-1 für den Anbau zugelassen (Wu et al. 2015).

Die Machbarkeit des Verfahrens bei Reis und Weizen wird gegenwärtig untersucht (Pioneer 2015, FSANZ 2013).

20. Zentromer-vermittelte Genomelimination

Das Verfahren der Zentromer-vermittelten Genomelimination nutzt gentechnische Methoden, um Haploiden-Induktionslinien zu erzeugen, und ermöglicht damit die Herstellung doppelhaploider Pflanzen (Ravi et al. 2014, Ravi & Chan 2013/2010). Da die gentechnische Veränderung im Endprodukt nicht mehr benötigt wird, können Pflanzen entstehen, die frei von extrazellulär eingeführter DNA sind (Murovec & Bohanec 2011, Chan 2010).

Das Verfahren wird auch als Zentromer-vermittelte Chromosomeneliminationstechnik (*centromere mediated chromosome elimination technique, CCE-technique*) bezeichnet (Camacho et al. 2014)

20.1 Beschreibung des Verfahrens

Bei der Zentromer-vermittelten Genomelimination werden neue, gentechnisch veränderte Haploiden-Induktionslinien hergestellt (Chan 2010). Werden Pflanzen mit diesen gentechnisch erzeugten Induktionslinien gekreuzt, entstehen unter anderem Nachkommen, die haploid sind und nur Chromosomen der gentechnisch nicht veränderten Pflanze enthalten. Aus den haploiden Pflanzen können entweder spontan oder nach Anwendung von Chromosomensatzverdoppelungsmethoden doppelhaploide Pflanzen entstehen.

20.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht

Die Zentromer-vermittelte Genomelimination bietet eine neue Möglichkeit, um doppelhaploide Pflanzen herzustellen (Chan 2010, Copenhaver & Preuss 2010). Doppelhaploide Pflanzen spielen in der Züchtung eine wichtige Rolle, weil Eigenschaften fixiert werden können, ohne dass Rückkreuzungen über mehrere Generationen vorgenommen werden müssen (Dwivedi et al. 2015, Ferrie & Möller 2011).

Da das Verfahren den Transfer von parentalen Chromosomen in ein maternales Zytoplasma möglich macht, lassen sich auch Pflanzen mit cytoplasmatischer männlicher Sterilität erzeugen (Chan 2010). Zudem könnte mit dem Verfahren bei polyploiden Pflanzen die Ploidie halbiert werden. Diskutiert wird auch eine mögliche Kombination mit dem *Reverse breeding* (Stower 2012, Wijnker et al. 2012).

20.3 Stand der Entwicklung

Die Machbarkeit der Zentromer-vermittelten Genomelimination ist im Jahr 2010 an Arabidopsis gezeigt worden (Ravi & Chan 2010). Veröffentlichungen über Anwendungen an anderen Pflanzenarten finden sich bisher nicht. Das Verfahren findet in der Pflanzenzüchtung jedoch grosses Interesse (Dwivedi et al. 2015, Tek et al. 2015, Comai 2014, Bhat 2011, Brownfield & Köhler 2011, Segui-Simarro et al. 2011, Marimuthu et al. 2011, Murovec & Bohanec 2011, Chan 2010, Copenhaver & Preuss 2010) und wird gegenwärtig bei mehreren Kulturarten erprobt – unter anderem bei Banane, Gerste, Maniok, Rutenhirse, Sojabohne und Zuckerrübe (Tek et al. 2015).

21. Virus-induziertes Gen-Silencing (VIGS)

Das Virus-induzierte Gen-Silencing (VIGS) ist ein Verfahren, bei dem rekombinante pflanzenvirale Vektoren eingesetzt werden, um die Expression von endogenen Pflanzengen stillzulegen (Schart & Visser 2009). Das Verfahren dient als Werkzeug für die funktionale Genomik und die Reverse Genetik (Di Stilio 2011, Purkayastha & Dasgupta 2009), wird aber auch bei der herkömmlichen sowie der Marker-unterstützten Züchtung eingesetzt (Senthil-Kumar & Mysore 2011b). Zudem wird VIGS auch als mögliches Werkzeug für NPZV diskutiert (Senthil-Kumar & Mysore 2011b), insbesondere im Zusammenhang mit der RNA-dirigierten DNA-Methylierung (Kanazawa et al. 2011a; Abschnitt 13), dem *Reverse Breeding* (Dirks et al. 2009; Abschnitt 18) und der Blühverfrühungstechnik (Sasaki et al. 2011; Abschnitt 15).

21.1 Beschreibung des Verfahrens

VIGS nutzt rekombinante virale Vektoren für das Silencing von endogenen Pflanzengenen. Die viralen Vektoren werden dabei nicht in Keimzellen eingebracht, sondern in somatische Zellen. Eine stabile Transformation der Pflanzen wird somit nicht beabsichtigt.

VIGS basiert hauptsächlich auf dem pflanzeigenen Prozess des siRNA-vermittelten RNA-Silencing. Bei diesem Prozess werden aus langer doppelsträngiger RNA (dsRNA) so genannte *small interfering RNAs* (siRNA) gebildet, die dazu führen, dass diejenigen mRNAs abgebaut werden, die Homologien zur dsRNA beziehungsweise siRNA aufweisen. Durch den Abbau der mRNA kommt es zum posttranskriptionellen Gen-Silencing (PTGS) der korrespondierenden Gene. Neben der Auslösung des PTGS ist es mit VIGS auch möglich, den pflanzeigenen Prozess der RNA-vermittelten DNA-Methylierung auszunutzen und damit ein transkriptionelles Gen-Silencing (TGS) zu bewirken (Kanazawa et al. 2011a/b). In diesen Fällen führen die siRNAs zur *de novo* Methylierung von Cytosinen und zwar in DNA-Regionen, die homolog zu den dsRNAs beziehungsweise siRNAs sind. Erfolgt die *de novo* Methylierung innerhalb von Promotor-Sequenzen, kann dies zum TGS des korrespondierenden Gens führen (Eamens et al. 2008, Matzke et al. 2007).

Um die oben beschriebenen Prozesse auszunutzen, werden beim VIGS Pflanzenviren so gentechnisch verändert, dass sie Teile der Sequenz desjenigen Pflanzengens (bzw. Promotors) besitzen, das stillgelegt werden soll. Werden solche rekombinanten Viren in die Pflanzenzellen eingebracht, kommt es durch die Replikation zur Bildung von dsRNA und damit zum PTGS oder TGS.

VIGS besteht hauptsächlich aus drei Schritten: (I) Herstellung der rekombinanten Vektoren, (II) Einschleusen der Vektoren in die Pflanze und (III) Silencing des Zielgens. Wird Material der behandelten Pflanze für die weitere Züchtung verwendet, folgt ein vierter Schritt, der darin besteht, den VIGS-Vektor zu entfernen.

Zur Herstellung der rekombinanten Vektoren können sowohl RNA- wie auch DNA-Pflanzenviren benutzt werden (Senthil-Kumar & Mysore 2011b, Purkayastha & Dasgupta 2009). Möglich ist auch der Einsatz von Satelliten-Viren (*satellite virus-induced silencing system*, SVISS; Gossele et al. 2002). Von Interesse sind insbesondere Viren beziehungsweise Vektoren, die in mehreren Pflanzenarten benutzt werden können und die schwach oder attenuiert sind, so dass sie wenige oder gar keine Krankheitssymptome in den Pflanzen auslösen.

Das Einschleusen der Vektoren in die Pflanzen kann mit verschiedenen Methoden gelingen, wobei die Wahl der Methode von der jeweiligen Pflanzenart und dem Vektor abhängt. Zu den möglichen Methoden gehören: biolistische Verfahren, die mechanische Inokulation von *in vitro* transkribierter RNA, die Inokulation von RNA aus Blattextrakten infizierter Pflanzen sowie die Agroinfektion und Agroinokulation (Stratmann & Hind 2011, Purkayastha & Dasgupta 2009, Robertson 2004). Bei den letzten beiden Verfahren werden die viralen Vektoren in T-DNA-Vektoren von Agrobakterien eingebracht (siehe Abschnitt 14).

VIGS ist in den weitaus meisten Fällen vorübergehend und dauert üblicherweise 2 bis 16 Wochen an. Es kann jedoch auch während der ganzen Lebensspanne von Pflanzen anhalten und – falls der virale Vektor übertragen oder im Falle eines TGS – an Nachkommen übertragen werden (Senthil-Kumar & Mysore 2011a/b, Becker & Lange 2010).

Die Selektion von Virus-freien Nachkommen kann mit unterschiedlichen Methoden erfolgen, wobei die Wahl der Methode davon abhängt, wie die verwendete Pflanze sich fortpflanzt und ob der eingesetzte Virus via Samen übertragen werden kann oder nicht (Senthil-Kumar & Mysore 2011b, Schaart & Visser 2009). Bei vegetativ vermehrten Pflanzen kann die Elimination der Viren mit speziellen Techniken wie Thermo-therapie, Kryotherapie und Meristemkultur gelingen (Senthil-Kumar & Mysore 2011b, Schaart & Visser 2009, Wang & Valkonen 2009/2008, Wang et al. 2008). Bei

sexuell vermehrten Pflanzen können die Samen weiter verwendet werden, falls der eingesetzte Virus nicht oder nicht hundertprozentig via Samen übertragen wird (Senthil-Kumar & Mysore 2011b, Schaart & Visser 2009).

21.2 Mögliche Anwendungen in der Pflanzenzucht

VIGS wird mehrheitlich in der Grundlagenforschung eingesetzt und zwar als Werkzeug für die funktionale Genomik und die Reverse Genetik (Becker & Lange 2010, Purkayastha & Dasgupta 2009, Robertson 2004). Die Resultate aus dieser Forschung wiederum können Anwendung in der Pflanzenzucht finden. So lassen sich mittels VIGS Kandidatengene identifizieren, die entweder zur Herstellung gentechnisch veränderter Pflanzen oder in der Marker-unterstützten Züchtung eingesetzt werden können (Senthil-Kumar & Mysore 2011b). Diese indirekte Anwendungsmöglichkeit ist für die vorliegende Arbeit nicht relevant, da sie entweder eindeutig zu GVO-Produkten oder eindeutig zu nicht-GVO-Produkten führt.

Relevant sind hingegen die direkten Anwendungsmöglichkeiten. Eine davon ist die Identifikation von Zuchtlinien mit gewünschten Eigenschaften. Pflanzen, die mit Hilfe von VIGS identifiziert werden, könnten dabei direkt als Eltern für die Züchtung eingesetzt werden. Da beim VIGS keine Gene in das Erbgut von Keimbahnzellen eingefügt werden sollten und der eingesetzte virale Vektor nicht via Samen übertragen werden muss, könnten somit Pflanzen entstehen, die frei von rekombinanten Nukleinsäuren sind.

Drei weitere Anwendungsmöglichkeiten, die derzeit in der Literatur diskutiert werden, bestehen darin, VIGS als Werkzeug für die RNA-dirigierte DNA-Methylierung (Kanazawa et al. 2011a/b; Abschnitt 13), das *Reverse Breeding* (Dirks et al. 2009; Abschnitt 18) und die Blühverfrühungs-Technik (Sasaki et al. 2011, Senthil-Kumar & Mysore 2011b; Abschnitt 15) zu verwenden. In allen drei Fällen können Pflanzen hergestellt werden, welche den eingesetzten viralen Vektor nicht mehr enthalten.

21.3 Stand der Entwicklung

VIGS ist Mitte der 1990er Jahre erstmals angewendet worden (Kumagai et al. 1995). Seither wurde das Verfahren stetig verfeinert und weiter entwickelt. Heute sind mehr als 30 verschiedene VIGS-Vektoren bekannt, die insgesamt an über 40 Pflanzenarten angewendet worden sind (Senthil-Kumar & Mysore 2011b).

Ob und in welchem Umfang VIGS derzeit in Pflanzenzuchtprogrammen zur Selektion von Elternpflanzen verwendet wird, geht aus den gesichteten Unterlagen nicht hervor.

Der Einsatz des VIGS-Verfahrens als Werkzeug für NPZV wird bei der Blühverfrühungs-Technik und der RNA-dirigierte DNA-Methylierung erprobt (Kanazawa et al. 2011a/b, Sasaki et al. 2011, Senthil-Kumar & Mysore 2011b).

22. Virus-unterstützte Genexpression

Die Virus-unterstützte Genexpression (VUGE) ist eine Technik, bei der pflanzenvirale Vektoren dazu benutzt werden, um in Pflanzen vorübergehend neu eingeführte Gene zu exprimieren. Das Verfahren ist weitgehend identisch mit dem im Abschnitt 21 beschriebenen VIGS mit dem Unterschied, dass die viralen Vektoren bei der VUGE nicht RNAi-Konstrukte sondern Expressionskassetten enthalten.

VUGE wird teilweise als Werkzeug für NPZV erprobt, insbesondere bei der NRE-Technik (Ali et al. 2015a/b, Mahfouz & Li 2011, Vainstein et al. 2011, Marton et al. 2010; Abschnitt 6) und der Blühverfrühungs-Technik (Yamagishi et al. 2011, Yamagishi & Yoshikawa 2011a/b; Abschnitt 15).

23. Transformation mit Wildtyp *Agrobacterium rhizogenes*

Die Transformation mit Wildtyp *Agrobacterium rhizogenes*, in der Literatur auch «Natürliche Transformation» genannt, ist ein Verfahren, bei dem die T-DNA des Ri-Plasmids der Bakterien in unveränderter Form in das Erbgut von Pflanzen übertragen wird (Kuligowska et al. 2015, Lütken et al. 2015). Auch wenn das Verfahren ohne den Einsatz rekombinanter DNA auskommt, enthalten die resultierenden Pflanzen artfremde Gene, weshalb sie als transgen gelten können. Es könnte entsprechend zu klären sein, ob die resultierenden Pflanzen rechtlich GVO sind oder nicht.

In Dänemark sind mit dem Verfahren kompakt wachsende Kalanchoe entwickelt worden (AgroTech 2015). In Italien fanden Freisetzungsversuche mit Wurzelstöcken von Kirschen statt, die mit Wildtyp *A. rhizogenes* transformiert worden sind (Rugini et al. 2015).

24. Konzepte für neue Pflanzenzuchtverfahren

24.1 Epigenetische Editierung

Die Epigenetische Editierung wird von verschiedenen Autoren als mögliches NPZV diskutiert, das zur gezielten Veränderung des Epigenoms von Pflanzen eingesetzt werden könnte (Bortesi & Fischer 2015, Kumar & Jain 2015, Fichtner et al. 2014, Zhang & Hsieh 2013).

Das Konzept der Epigenetischen Editierung ist vergleichbar mit dem NRE-Verfahren (Abschnitt 6). Anders als beim NRE-Verfahren werden dabei nicht ortsspezifische Nukleasen verwendet, sondern Enzyme, die durch eine Fusion von programmierbaren DNA-Bindungsdomänen (ZF, TALE oder dCas) mit Chromatinmodifikationsdomänen (zum Beispiel Methylasen, Demethylasen oder Histonacetylasen) hergestellt werden. Mit solchen synthetischen Enzymen – so die Idee – sollen sich in Pflanzen an vorbestimmten Orten des Erbguts epigenetische Veränderungen erzeugen lassen. Ausserhalb des Pflanzenreichs ist die Funktionalität solcher Enzyme bereits gezeigt worden (Keung et al. 2015, Köeferle et al. 2015).

Da die mit den synthetischen Enzymen neu erzeugten Methylierungsmuster stabil weiter vererbt werden können, wäre die Anwesenheit der Gene, die für die synthetischen Enzyme kodieren, in der Pflanze nur vorübergehend für die Erzeugung der Epiallele notwendig. Entsprechend könnten sich mit der Epigenetischen Editierung transgenfreie Pflanzen erzeugen lassen.

24.2 Transgen-basierte rekurrente Selektion

Die Transgen-basierte rekurrente Selektion ist ein von Tanaka (2010) vorgeschlagenes Verfahren, das bei selbstbefruchtenden Pflanzenarten ermöglichen soll, Gene für bestimmte Merkmale in einer Population anzureichern, ohne die genetische Basis einzuengen. Das Konzept beruht darauf, Pflanzen gentechnisch so zu verändern, dass sie eine positiv wie negativ selektierbare männliche Sterilität aufweisen. Da die gentechnische Veränderung im Endprodukt nicht mehr benötigt wird, können aus dem Verfahren transgenfreie Pflanzen hervorgehen (Tanaka 2010).

24.3 Gezielte chemische Mutagenese

Die gezielte chemische Mutagenese wird von COGEM (2006) als mögliches NPZV diskutiert. Die Idee hinter dem Verfahren ist, mutagene Substanzen an Oligonukleotide zu koppeln, um damit an vorbestimmten Orten des Erbguts Mutationen zu erzeugen. Die Funktion der Oligonukleotide besteht dabei darin, die mutagene Substanz an die Zielsequenz im Erbgut zu lenken. Konkrete Beispiele von Anwendungen des Verfahrens an Pflanzen finden sich in der Literatur bisher nicht.

Referenzen²

ACRE (2011). Advice on a plant breeding technique involving oligo-directed mutagenesis: RTDS™. Advisory Committee on Releases to the Environment (ACRE). <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download;jsessionid=1D97E005B0CA37850AC99E4EA5C56669?doi=10.1.1.392.1636&rep=rep1&type=pdf>.

AgroTech (2015). AgroTech behind a new biotechnological method. <http://agrotech.dk/uk/cases/agrotech-behind-new-biotechnological-method>

Aguero, C.B., Uratsu, S.L., Greve, C., Powell, A.L.T., Labavitch, J.M., Meredith, C.P. & Dandekar, A.M. (2005). Evaluation of tolerance to Pierce's disease and Botrytis in transgenic plants of *Vitis vinifera* L. expressing the pear PGIP gene. *Molecular Plant Pathology* 6: 43 – 51.

Ainley, W.M., Sastry-Dent, L., Welter, M.E., Murray, M.G., Zeitler, B., Amora, R., Corbin, D.R., Miles, R.R., Arnold, N.L., Strange, T.L., Simpson, M.A., Cao, Z., Carroll, C., Pawelczak, K.S., Blue, R., West, K., Rowland, L.M., Perkins, D., Samuel, P., Dewes, C.M., Shen, L., Sriram, S., Evans, S.L., Rebar, E.J., Zhang, L., Gregory, P.D., Urnov, F.D., Webb, S.R. & Petolino J.F. (2013). Trait stacking via targeted genome editing. *Plant Biotechnology Journal* 11: 1126 – 1134.

Albacete, A., Martínez-Andújar, C., Martínez-Pérez, A., Thompson, A.J., Dodd, I.C. & Pérez-Alfocea, F. (2015). Unravelling rootstock × scion interactions to improve food security. *Journal of Experimental Botany* 66: 2211 – 2226.

Ali, Z., Abul-Faraj, A., Li, L., Ghosh, N., Piatek, M., Mahjoub, A., Aouida, M., Piatek, A., Voytas, D.F., Dinesh-Kumar, S. & Mahfouz, M.M. (2015a). Efficient virus-mediated genome editing in plants using the CRISPR/Cas9 system. *Molecular Plant* 8: 1288 – 1291.

Ali, Z., Abul-faraj, A., Piatek, M. & Mahfouz, M.M. (2015b). Activity and specificity of TRV-mediated gene editing in plants. *Plant Signaling & Behavior* 10: e1044191.

An, C., Orbović, V. & Mou, Z. (2013). An efficient intragenic vector for generating intragenic and cisgenic plants in citrus. *American Journal of Plant Sciences* 4: 2131.

Arrieta-Montiel, M. & Mackenzie, S. (2011). Plant mitochondrial genomes and recombination. *In*: Kempken, F. (ed.), *Plant Mitochondria. Advances in Plant Biology* 1, Springer, New York, pp. 65 – 82.

BAFU (2015). Freisetzungsversuche mit GVO. www.bafu.admin.ch/biotechnologie/01756/08902/index.html?lang=de

Bai, S., Kasai, A., Yamada, K., Li, T. & Harada, T. (2011). Mobile signal transported over a long distance induces systemic transcriptional gene silencing in a grafted partner. *Journal of Experimental Botany* 62: 4561 – 4570.

Baltes, N.J. & Voytas, D.F. (2015). Enabling plant synthetic biology through genome engineering. *Trends in Biotechnology* 32: 120 – 131.

Baltes, N.J., Gil-Humanes, J., Cermak, T., Atkins, P.A. & Voytas, D.F. (2014). DNA replicons for plant genome engineering. *The Plant Cell* 26: 151 – 163.

² Die in den Referenzen angegebenen Webseiten sind alle am 20. Dezember 2015 zum letzten Mal besucht worden.

Barabaschi, D., Tondelli, A., Desiderio, F., Volante, A., Vaccino, P., Valè, G. & Cattivelli, L. (2016). Next generation breeding. *Plant Science* 242: 3 – 13.

Becker, A. & Lange M. (2010). VIGS - genomics goes functional. *Trends in Plant Science* 15: 1 – 4.

Beetham, P.R., Kipp, P.B., Sawycky, X.L., Arntzen, C.J. & May, G.D. (1999). A tool for functional plant genomics: chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 8774 – 8778.

Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S. & Nekrasov, V. (2013). Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods* 9: 39.

Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., Patron, N.J. & Nekrasov, V. (2015). Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Current Opinion in Biotechnology* 32: 76 – 84.

Benjamin, I., Kenigsbuch, D., Galperin, M., Abrameto, J.A. & Cohen, Y. (2009). Cisgenic melons over expressing glyoxylate-aminotransferase are resistant to downy mildew. *European Journal of Plant Pathology* 125: 355 – 365.

Bhat, S.R. (2011). Genetic engineering of apomixis in plants: closer to reality. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 20: 1 – 4.

Pioneer (2015). Seed Production Technology. www.pioneer.com/CMRoot/Pioneer/About_Global/our_research/enabling_technologies/enabling_technologies_sheets/Tech_SPT_2015.pdf

Bock, R. (2014). Genetic engineering of the chloroplast: novel tools and new applications. *Current Opinion in Biotechnology* 26: 7 – 13.

Böhlenius, H., Huang, T., Charbonnel-Campaa, L., Brunner, A.M., Jansson, S., Strauss, S.H. & Nilsson, O. (2006). The conserved CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science* 312: 1040 – 1043.

Bortesi, L. & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances* 33: 41 – 52.

Braverman, M. (2013). Request for determination whether TraitUP-FB100 meets the definition of a regulated article. www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/rutgers_air_traitup_plasmids.pdf.

Breyer, D., Herman, P., Brandenburger, A., Gheysen, G., Remaut, E., Soumillon, P., Van Doorselaere, J., Custers, R., Pauwels, K., Sneyers, M. & Reheul, D. (2009). Genetic modification through oligonucleotide-mediated mutagenesis. A GMO regulatory challenge? *Environmental Biosafety Research* 8: 57 – 64.

Breyer, D., Kopertekh, L. & Reheul, D. (2014). Alternatives to antibiotic resistance marker genes for in vitro selection of genetically modified plants – Scientific developments, current use, operational access and biosafety considerations. *Critical Reviews in Plant Sciences* 33: 286 – 330.

Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z.B. & Van Eck, J. (2014). Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant Physiology* 166: 1292 – 1297.

Brownfield, L. & Köhler, C. (2011). Unreduced gamete formation in plants: mechanisms and prospects. *Journal of Experimental Botany* 62: 1659 – 1668.

Brummell, D. A., Watson, L. M., Zhou, J., McKenzie, M. J., Hallett, I. C., Simmons, L., Carpenter, M. & Timmerman-Vaughan, G. M. (2015). Overexpression of STARCH BRANCHING ENZYME II increases short-chain branching of amylopectin and alters the physicochemical properties of starch from potato tuber. *BMC Biotechnology* 15: 28.

Cai, Y., Chen, L., Liu, X., Sun, S., Wu, C., Jiang, B., Han, T. & Hou, W. (2015). CRISPR/Cas9-mediated genome editing in soybean hairy roots. *PLoS one* 10: e0136064.

- Camacho, A., Van Deynze, A., Chi-Ham, C. & Bennett, A. B. (2014). Genetically engineered crops that fly under the US regulatory radar. *Nature Biotechnology* 32: 1087 – 1091.
- Cantos, C., Francisco, P., Trijatmiko, K.R., Slamet-Loedin, I. & Chadha-Mohanty, P.K. (2014). Identification of «safe harbor» loci in indica rice genome by harnessing the property of zinc-finger nucleases to induce DNA damage and repair. *Frontiers in Plant Science* 5: 1 – 8.
- Cerezo, S., Barcelo, A., Samach, A., Mercado, J.A. & Pliego-Alfaro, F. (2014). Over-expression of an FT homologous gene of *Medicago truncatula* induces early flowering and a modified branching habit in olive plants. *In: Proceedings of the 1st International Rapid Cycle Crop Breeding Conference; 7–9 January; Leesburg, VA, USA.*
- Cermak, T., Doyle, E.L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J.A., Somia, N.V., Bogdanove, A.J. & Voytas, D.F. (2011). Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research* 39: e82
- Cermak, T., Baltes, N.J., Cegan, R., Zhang, Y. & Voytas, D.F. (2015). High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biology* 16: 1 – 15.
- Cervera, M., Navarro, L. & Pena, L. (2009). Gene stacking in 1-year-cycling APETALA1 citrus plants for a rapid evaluation of transgenic traits in reproductive tissues. *Journal of Biotechnology* 140: 278 – 282.
- Chan, S.W.L. (2010). Chromosome engineering: power tools for plant genetics. *Trends in Biotechnology* 28: 605 – 610.
- Chao, Q., Sullivan, C.D., Geta, J.M., Gleason, K.B., Sass, P.M., Nicolaides, N.C. & Grasso, L. (2005) Rapid generation of plant traits via regulation of DNA mismatch repair. *Plant Biotechnology Journal* 3: 399 – 407.
- Char, S.N., Unger-Wallace, E., Frame, B., Briggs, S.A., Main, M., Spalding, M.H., Vollbrecht, E., Wang, K. & Yang, B. (2015). Heritable site-specific mutagenesis using TALENs in maize. *Plant Biotechnology Journal* 13: 1002 – 1010.
- Chawla, R., Shakya, R. & Rommens, C.M. (2012). Tuber-specific silencing of asparagine synthetase-1 reduces the acrylamide forming potential of potatoes grown in the field without affecting tuber shape and yield. *Plant Biotechnology Journal* 10: 913 – 924.
- Chen, K. & Gao, C. (2014). Targeted genome modification technologies and their applications in crop improvements. *Plant Cell Reports* 33: 575 – 583.
- Chen, K. & Gao, C. (2015). Developing CRISPR technology in major crop plants. *In: Zhang, F., Puchta, H. & Thomson, J.G. (eds.), Advances in New Technology for Targeted Modification of Plant Genomes.* Springer New York, pp. 145 – 159.
- Chen, K., Shan, Q. & Gao, C. (2014). An efficient TALEN mutagenesis system in rice. *Methods* 69: 2 – 8.
- Chizzali, C., Gusberti, M., Schouten, H.J., Gessler, C. & Broggini, G.A. (2015). Cisgenic Rvi6 scab-resistant apple lines show no differences in Rvi6 transcription when compared with conventionally bred cultivars. *Planta in press.*
- Cibus (2015). Products. www.cibus.com/products.php
- Cigan, A.M., Unger-Wallace, E. & Haug-Collet, K. (2005). Transcriptional gene silencing as a tool for uncovering gene function in maize. *Plant Journal* 43: 929 – 940.
- Clasen, B.M., Stoddard, T.J., Luo, S., Demorest, Z.L., Li, J., Cedrone, F., Tibebu, R., Davison, S., Ray, E.E., Daulhac, A., Coffman, A., Yabandith, A., Retterath, A., Haun, W., Baltes, N.J., Mathis, L., Voytas, D.F. & Zhang, F. (2016). Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnology Journal* 14: 169 – 176.
- COGEM (2006). New techniques in plant biotechnology. COGEM report CGM/061024-02. The Netherlands Commission on Genetic Modification. www.cogem.net/index.cfm/en/publications/publicatie/new-techniques-in-plant-biotechnology.

- COGEM (2010). The status of oligonucleotides within the context of site-directed mutagenesis. COGEM advice and report CGM/100701-03. The Netherlands Commission on Genetic Modification. www.cogem.net/index.cfm/en/publications/publicatie/the-status-of-oligonucleotides-within-the-context-of-site-directed-mutagenesis.
- Comai, L. (2014). Genome elimination: translating basic research into a future tool for plant breeding. *PLoS biology* 12: e1001876.
- Conner, A.J., Barrell, P.J., Baldwin, S.J., Lokerse, A.S., Cooper, P.A., Erasmuson, A.K., Nap, J.-P. & Jacobs, J.M.E. (2007). Intragenic vectors for gene transfer without foreign DNA. *Euphytica* 154: 341 – 353.
- Connor, T. (2010). New techniques for genetic modification of plants. Internal report prepared for The New Zealand Institute for Plant & Food Research Limited. www.esr.cri.nz/assets/Future-Foods/Reports/New-techniques-for-plant-GM.pdf.
- Copenhaver, G.P. & Preuss, D. (2010). Haploidy with histones. *Nature Biotechnology* 28: 423 – 424.
- Corredoira, E., Valladares, S., Allona, I., Aragoncillo, C., Vieitez, A.M. & Ballester, A. (2012). Genetic transformation of European chestnut somatic embryos with a native thaumatin-like protein (CsTL1) gene isolated from *Castanea sativa* seeds. *Tree Physiology* 32: 1389 – 1402.
- Coutos-Thevenot, P., Poinssot, B., Bonomelli, A., Yean, H., Breda, C., Buffard, D., Esnault, R., Hain, R. & Boulay, M. (2001). In vitro tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *Vst1* gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter. *Journal of Experimental Botany* 52: 901 – 910.
- Crismani, W., Girard, C. & Mercier, R. (2013). Tinkering with meiosis. *Journal of Experimental Botany* 64: 55 – 65.
- Curtin, S.J., Zhang, F., Sander, J.D., Haun, W.J., Starker, C., Baltus, N.J., Reyon, D., Dahlborg, E.J., Goodwin, M.J., Coffman, A.P., Dobbs, D., Joung, J.K., Voytas, D.F. & Stupar, R.M. (2011). Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases breakthrough technologies. *Plant Physiology* 156: 466 – 473.
- Curtin, S.J., Voytas, D.F. & Stupar, R.M. (2012). Genome engineering of crops with designer nucleases. *The Plant Genome* 5: 42 – 50.
- Cusin, R., Maraschin, F., Nogueira, J.C., Christino, J., Silveira, C., Buffon, V., Revers, L.F. & Alves, S.A. (2014). Use of plant plasmids for transferring the resistance to *venturia inaequalis* in apple cultivars (*Malus × domestica* Borkh.). Resúmenes de trabajos presentados en el XV Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal. <https://fisiologiavegetal2014.wordpress.com/abstract-index/abstracts>.
- Daboussi, F., Stoddard, T.J. & Zhang, F. (2015). Engineering meganuclease for precise plant genome modification. *In: Zhang, F., Puchta, H. & Thomson, J.G. (eds.), Advances in New Technology for Targeted Modification of Plant Genomes*. Springer New York, pp. 21 – 38.
- D'Halluin, K., Vanderstraeten, C., Hulle, J., Rosolowska, J., Den Brande, I., Pennewaert, A., D'Hont, K., Bossut, M., Jantz, D., Ruiters, R. & Broadhvest, J. (2013). Targeted molecular trait stacking in cotton through targeted double-strand break induction. *Plant Biotechnology Journal* 11: 933 – 941.
- Dhekney, S.A., Li, Z.T. & Gray, D.J. (2011). Grapevines engineered to express cisgenic *Vitis vinifera* thaumatin-like protein exhibit fungal disease resistance. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 47: 458 – 466.
- Di Stilio, V.S. (2011). Empowering plant evo- devo: Virus induced gene silencing validates new and emerging model systems. *BioEssays* 33: 783 – 783.
- Dietz, J. (2013). Israeli research intrigues global investors. www.agadvance.com/issues/sep-2013/israeli-research-intrigues-global-investors.aspx.
- Dirks, R.H.G., van Dun, C.M.P. & Reinink, K. (2001). Reverse Breeding. Intl. Publ. No. WO 03/017753 A2. World Intellectual Property Organisation. Geneva, Switzerland.

- Dirks, R., van Dun, K., de Snoo, C.B., van den Berg, M., Lelivelt, C.L., Voermans, W., Woudenberg, L., de Wit, J.P., Reinink, K., Schut, J.W., van der Zeeuw, E., Vogelaar, A., Freymark, G., Gutteling, E.W., Keppel, M.N., van Drongelen, P., Kieny, M., Ellul, P., Touraev, A., Ma, H., de Jong, H. & Wijnker, E. (2009). Reverse breeding: a novel breeding approach based on engineered meiosis. *Plant Biotechnology Journal* 7: 837 – 845.
- Djukanovic, V., Smith, J., Lowe, K., Yang, M., Gao, H., Jones, S., Nicholson, M.G., West, A., Lape, J, Falco, S.C., Jantz, D. & Alexander Lyznik, L. (2013). Male-sterile maize plants produced by targeted mutagenesis of the cytochrome P450-like gene (MS26) using a redesigned I-CreI homing endonuclease. *The Plant Journal* 76: 888 – 899.
- Dong, C., Beetham, P., Vincent, K. & Sharp, P. (2006). Oligonucleotide-directed gene repair in wheat using a transient plasmid gene repair assay system. *Plant Cell Reports* 25: 457 – 465.
- Du, H., Zeng, X., Zhao, M., Cui, X., Wang, Q., Yang, H., Cheng, H. & Yu, D. (2016). Efficient targeted mutagenesis in soybean by TALENs and CRISPR/Cas9. *Journal of Biotechnology* 217: 90 – 97.
- Duan, Y.X., Fan, J. & Guo, W.W. (2010). Regeneration and characterization of transgenic kumquat plants containing the Arabidopsis APETALA1 gene. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 100: 273 – 281.
- Dutt, M., Z.T. Li, K. Kelley, S.A. Dhekney, M. Van Aman, J. Tattersall, & D.J. Gray (2007). Transgenic rootstock protein transmission in grapevines. *Acta Horticulturae (ISHS)* 738: 749 – 754.
- Dwivedi, S.L., Britt, A.B., Tripathi, L., Sharma, S., Upadhyaya, H.D. & Ortiz, R. (2015). Haploids: Constraints and opportunities in plant breeding. *Biotechnology Advances* 33: 812 – 829.
- Eamens, A., Wang, M.B., Smith, N.A. & Waterhouse, P.M. (2008). RNA silencing in plants: yesterday, today and tomorrow. *Plant Physiology* 147: 456 – 468.
- Eckerstorfer, M., Miklau, M. & Gaugitsch, H. (2014). New Plant breeding techniques and risks associated with their application. Umweltbundesamt, Wien. www.umweltbundesamt.at/fileadmin/site/publikationen/REP0477.pdf.
- EFSA (2012). Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO), European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. *EFSA Journal* 10: 2561. www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/doc/2561.pdf
- Elmer, J.S., Sunter, G., Gardiner, W.E., Brand, L., Browning, C.K., Bisaro, D.M. & Rogers, S.G. (1988). Agrobacterium-mediated inoculation of plants with tomato golden mosaic virus DNAs. *Plant Molecular Biology* 10: 225 – 234.
- Endo, M. & Toki, S. (2013). Creation of herbicide-tolerant crops by gene targeting. *Journal of Pesticide Science* 38: 49 – 59.
- Endo, T., Shimada, T., Fujii, H., Kobayashi, Y., Araki, T. & Omura, M. (2005). Ectopic expression of a FT homolog from Citrus confers an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Transgenic Research* 14: 703 – 712.
- Endo, M., Osakabe, K., Ono, K., Handa, H., Shimizu, T. & Toki, S. (2007). Molecular breeding of a novel herbicide-tolerant rice by gene targeting. *Plant Journal* 52: 157 – 166.
- Endo, M., Mikami, M. & Toki, S. (2015a). Multi-gene knockout utilizing off-target mutations of the CRISPR/Cas9 system in rice. *Plant and Cell Physiology* 56: 41 – 47.
- Endo, M., Kumagai, M., Motoyama, R., Sasaki-Yamagata, H., Mori-Hosokawa, S., Hamada, M., Kanamori, H., Nagamura, Y., Katayose, Y., Itoh, T. & Toki, S. (2015b). Whole-Genome analysis of herbicide-tolerant mutant rice generated by Agrobacterium-mediated gene targeting. *Plant and Cell Physiology* 56: 116 – 125.
- Espinoza, C., Schlechter, R., Herrera, D., Torres, E., Serrano, A., Medina, C. & Arce-Johnson, P. (2013). Cisgenesis and intragenesis: new tools for improving crops. *Biological Research* 46: 323 – 331.
- Fan, D., Liu, T., Li, C., Jiao, B., Li, S., Hou, Y. & Luo, K. (2015). Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Populus* in the first generation. *Scientific Reports* 5: 12217.

- Febres, V., Fisher, L., Khalaf, A. & Moore, G.A. (2011). Citrus transformation: challenges and prospects. <http://cdn.intechweb.org/pdfs/18815.pdf>.
- Feng, Z., Zhang, B., Ding, W., Liu, X., Yang, D.L., Wei, P., Cao, F., Zhu, S., Zhang, F., Mao, Y. & Zhu, J.K. (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Research* 23: 1229 – 1232.
- Feng, C., Yuan, J., Wang, R., Liu, Y., Birchler, J.A. & Han, F. (2015). Efficient targeted genome modification in maize using CRISPR/Cas9 system. *Journal of Genetics and Genomics* *in press*.
- Ferrie, A.M.R. & Möllers, C. (2011). Haploids and doubled haploids in Brassica spp. for genetic and genomic research. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 104: 375 – 386.
- Fichtner, F., Castellanos, R.U. & Ülker, B. (2014). Precision genetic modifications: a new era in molecular biology and crop improvement. *Planta* 239: 921 – 939.
- Flachowsky, H., Hättasch, C., Peil, A. & Hanke, M.-V. (2006). Transcription profiling on transgenic apple plants after over-expression of genes, which are involved in the flower development. *Acta Horticulturae* 763: 215 – 222.
- Flachowsky, H., Peil, A., Sopanen, T., Elo, A. & Hanke, V. (2007). Overexpression of BpMADS4 from silver birch (*Betula pendula* Roth.) induces early flowering in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Plant Breeding* 126: 137 – 145.
- Flachowsky, H., Hanke, M.V., Peil, A., Strauss, S.H. & Fladung, M. (2009). A review on transgenic approaches to accelerate breeding of woody plants. *Plant Breeding* 128: 217 – 226.
- Flachowsky, H., Le Roux, P. M., Peil, A., Patocchi, A., Richter, K. & Hanke, M.-V. (2011). Application of a high-speed breeding technology to apple (*Malus × domestica*) based on transgenic early flowering plants and marker-assisted selection. *New Phytologist* 192: 364 – 377.
- Fladung, M. (2011). Gentechnisch veränderte Bäume für eine nachhaltige, umweltverträgliche und ressourcenschonende Produktion von Holz für die Energiegewinnung. *Gesunde Pflanzen* 63: 101 – 110.
- Forster, B.P., Heberle-Bors, E., Kasha, K.J. & Touraev, A. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plant Science* 12: 368 – 375.
- Freiman, A., Shlizerman, L., Golubowicz, S., Yabloviz, Z., Korchinsky, R., Cohen, Y., Samach, A., Chevreau, E., Le Roux, P.M, Patocchi, A. & Flaishman, M.A. (2012). Development of a transgenic early flowering pear (*Pyrus communis* L.) genotype by RNAi silencing of PctFL1-1 and PctFL1-2. *Planta* 235: 1239 – 1251.
- FSANZ (2013). Workshop report: New plant breeding techniques. Food Standards Australia New Zealand (FSANZ). www.foodstandards.gov.au/publications/Documents/New%20Plant%20Breeding%20Techniques%20Workshop%20Report.pdf.
- Fujimoto, R., Sasaki, T., Inoue, H. & Nishio, T. (2008). Hypomethylation and transcriptional reactivation of retrotransposon-like sequences in ddm1 transgenic plants of Brassica rapa. *Plant Molecular Biology* 66: 463 – 473.
- Gadaleta, A., Giancaspro, A., Blechl, A.E. & Blanco, A. (2008). A transgenic durum wheat line that is free of marker genes and expresses 1Dy10. *Journal of Cereal Science* 48: 439 – 445.
- Gambino, G., Gribaudo, I., Leopold, S., Scharl, A. & Laimer, M. (2005). Molecular characterization of grapevine plants transformed with GFLV resistance genes: I. *Plant Cell Reports* 24: 655 – 662.
- Gamper, H.B., Parekh, H., Rice, M.C., Bruner, M., Youkey, H. & Kmiec, E.B. (2000). The DNA strand of chimeric RNA/DNA oligonucleotides can direct gene repair/conversion activity in mammalian and plant cell-free extracts. *Nucleic Acids Research* 28: 4332 – 4339.
- Gao, H., Smith, J., Yang, M., Jones, S., Djukanovic, V., Nicholson, M.G., West, A., Bidney, D., Falco, S.C., Jantz, D. & Lyznik, L.A. (2010). Heritable targeted mutagenesis in maize using a designed endonuclease. *Plant Journal* 61: 176 – 187.

- Gao, J., Wang, G., Ma, S., Xie, X., Wu, X., Zhang, X., Wu, Y., Zhao, P. & Xia, Q. (2015). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology* 87: 99 – 110.
- Geier, T., Eimert, K., Scherer, R. & Nickel, C. (2008). Production and rooting behaviour of rolB-transgenic plants of grape rootstock 'Richter 110' (*Vitis berlandieri* X *V. rupestris*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 94: 269 – 280.
- Gelvin, S.B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 16 – 37.
- Gocal, G.F., Schöpke, C. & Beetham, P.R. (2015). Oligo-mediated targeted gene editing. *In: Zhang, F., Puchta, H. & Thomson, J.G. (eds.), Advances in new technology for targeted modification of plant genomes.* Springer Science+Business Media New York, pp. 73 – 89.
- Gossele, V.V., Fache, I.I., Meulewaeter, F., Cornelissen, M. & Metzlauff, M. (2002). SVISS – a novel transient gene silencing system for gene function discovery and validation in tobacco. *Plant Journal* 32: 859 – 866.
- Gover, O., Peretz, Y., Mozes-Koch, R., Maori, E., Rabinowitch, H.D. & Sela, I. (2014). Only minimal regions of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) are required for replication, expression and movement. *Archives of Virology* 159: 2263 – 2274.
- Grimsley, N.H., Hohn, B., Hohn, T. & Walden, R. (1986). Agroinfection, an alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 83: 3282 – 3286.
- Gurushidze, M., Hensel, G., Hiekel, S., Schedel, S., Valkov, V. & Kumlehn, J. (2014). True-breeding targeted gene knock-out in barley using designer TALE-nuclease in haploid cells. *PloS one* 9: e92046.
- Hague, J., Tilelli, M., Cunha, D., Nelson, K., Kausch, A., Heffelfinger, C., Moreno, M. & Dellaporta, S. (2014). In situ embryo rescue as a novel method for recovery of non-GMP hybrids from wide crosses. ASPB meeting at the University of Rhode Island's Center for Biotechnology and Life Sciences, March 29-30, Rhode Island, USA.
- Halterman, D., Guenther, J., Collinge, S., Butler, N. & Douches, D. (2015). Biotech potatoes in the 21st century: 20 years since the first biotech potato. *American Journal of Potato Research in press.*
- Han, J. S., Park, S., Shigaki, T., Hirschi, K. D., & Kim, C. K. (2009). Improved watermelon quality using bottle gourd rootstock expressing a Ca²⁺/H⁺ antiporter. *Molecular Breeding* 24: 201 – 211.
- Han, K.M., Dharmawardhana, P., Arias De Ares, R.S., Ma, C., Busov, V. & Strauss, S.H. (2011). Gibberellin-associated cisgenes modify growth, stature and wood properties in *Populus*. *Plant Biotechnology Journal* 9: 162 – 178.
- Han, J.S., Park, K.I., Jeon, S.M., Park, S., Naing, A.H. & Kim, C.K. (2015). Assessments of salt tolerance in a bottle gourd line expressing the Arabidopsis H⁺-pyrophosphatase AVP1 gene and in a watermelon plant grafted onto a transgenic bottle gourd rootstock. *Plant Breeding* 134: 233 – 238.
- Hancock, W.G., Kuruparthi, V., Kernodle, S.P. & Lewis, R.S. (2015). Identification of maternal haploids of *Nicotiana tabacum* aided by transgenic expression of green fluorescent protein: evidence for chromosome elimination in the *N. tabacum* × *N. africana* interspecific cross. *Molecular Breeding* 35: 1 – 14.
- Haroldsen, V.M., Szczerba, M.W., Aktas, H., Lopez-Baltazar, J., Odias, M.J., Chi-Ham, C.L., Labavitch, J.M., Bennett, A.B. & Powell, A.L.T. (2012). Mobility of transgenic nucleic acids and proteins within grafted rootstocks for agricultural improvement. *Frontiers in Plant Science* 3: 39.
- Haun, W., Coffman, A., Clasen, B.M., Demorest, Z.L., Lowy, A., Ray, E., Retterath, A., Stoddard, T., Juillerat, A., Cedrone, F., Mathis, L., Voytas, D.F. & Zhang F. (2014). Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnology Journal* 12: 934 – 940.
- Heffelfinger, C., Deresienski, A.P., Nelson, K.A., Moreno, M.A., Hague, J.P., Dellaporta, S.L. & Kausch, A.P. (2015). Genomic characterization of interspecific hybrids and an admixture population derived from *Panicum amarum* × *P. virgatum*. *The Plant Genome* 8: 1 – 12.

- Heilersig, B.H., Loonen, A.E., Janssen, E.M., Wolters, A.M. & Visser, R.G. (2006). Efficiency of transcriptional gene silencing of GBSSI in potato depends on the promoter region that is used in an inverted repeat. *Molecular Genetics and Genomics* 275: 437 – 449.
- Hemmer, C., Vigne, E., Goldschmidt, V., Komar, K., Marmonier, A., Valat, L., Demangeat, G., Vigneron, S., Masson, J.E. & Lemaire, O. (2009). Transgenic rootstocks expressing GFLV coat protein gene in a three years field trial; resistance assessment, impact on GFLV diversity and exchanges between rootstock and scion. http://www.ogm.gouv.fr/IMG/pdf/doc7_cle862ef5.pdf.
- Higo, H., Tahir, M., Takashima, K., Miura, A., Watanabe, K., Tagiri, A., Ugaki, M., Ishikawa, R., Eiguchi, M., Kurata, N., Sasaki, T., Richards, E., Takano, M., Kishimoto, N., Kakutani, T. & Habu, Y. (2012). DDM1 (Decrease in DNA Methylation) genes in rice (*Oryza sativa*). *Molecular Genetics and Genomics* 287: 785 – 792.
- Hoenicka, H., Lehnhardt, D., Nilsson, O., Hanelt, D., & Fladung, M. (2014). Successful crossings with early flowering transgenic poplar: interspecific crossings, but not transgenesis, promoted aberrant phenotypes in offspring. *Plant Biotechnology Journal* 12: 1066 – 1074.
- Hohn, B. & Puchta, H. (1999). Gene therapy in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 8321 – 8323.
- Holme, I.B., Dionisio, G., Brinch-Pedersen, H., Wendt, T., Madsen, C.K., Vincze, E. & Holm, P. (2012). Cisgenic barley with improved phytase activity. *Plant Biotechnology Journal* 10: 237 – 247.
- Holme, I.B., Wendt, T. & Holm, P.B. (2013). Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnology Journal* 11: 395 – 407.
- Honig, A., Marton, I., Rosenthal, M., Smith, J. J., Nicholson, M. G., Jantz, D., Zuker, A. & Vainstein, A. (2015). Transient expression of virally delivered meganuclease in planta generates inherited genomic deletions. *Molecular Plant* 8: 1292 – 1294.
- Hsu, C.Y., Liu, Y., Luthe, D.S. & Yuceer, C. (2006). Poplar FT2 shortens the juvenile phase and promotes seasonal flowering. *Plant Cell* 18: 1846 – 1861.
- Iida, S. & Terada, R. (2005). Modification of endogenous natural genes by gene targeting in rice and other higher plants. *Plant Molecular Biology* 59: 205 – 219.
- ISB (2015). USDA field tests of GM crops. Information Systems for Biotechnology. www.isb.vt.edu/search-release-data.aspx
- Ito, Y., Nishizawa-Yokoi, A., Endo, M., Mikami, M. & Toki, S. (2015). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 467: 76 – 82.
- Jacobs, T.B., LaFayette, P.R., Schmitz, R.J. & Parrott, W.A. (2015). Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnology* 15: 16.
- Jansch, M., Paris, R., Amoako-Andoh, F., Keulemans, W., Davey, M. W., Pagliarani, G., Tartarini, S. & Patocchi, A. (2014). A phenotypic, molecular and biochemical characterization of the first cisgenic scab-resistant apple variety 'Gala'. *Plant Molecular Biology Reporter* 32: 679 – 690.
- Jia, H. & Wang, N. (2014). Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. *PLoS One* 9: e93806.
- Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B. & Weeks, D.P. (2013). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Research* 41: e188.
- Jo, K.R., Kim, C.J., Kim, S.J., Kim, T.Y., Bergervoet, M., Jongsma, M.A., Visser, R.G.F., Jacobsen, E. & Vossen, J.H. (2014). Development of late blight resistant potatoes by cisgene stacking. *BMC Biotechnology* 14: 50.

- Joshi, S.G., Schaart, J.G., Groenwold, R., Jacobsen, E., Schouten, H.J. & Krens, F.A. (2011). Functional analysis and expression profiling of HcrVf1 and HcrVf2 for development scab resistant cisgenic and intragenic apples. *Plant Molecular Biology* 75: 579 – 591.
- JRC (2015). Deliberate Release – GMO Register. Joint Research Centre. http://gmoinfo.jrc.ec.europa.eu/gmp_browse.aspx
- Kanazawa, A. & Kasai, M. (2015). Induction of stable epigenetic gene silencing in plants using a virus vector. *In: Mysore, K.S. & Senthil-Kumar, M. (eds.), Plant Gene Silencing: Methods and Protocols.* Springer Science, New York, pp. 129 – 137.
- Kanazawa, A., Inaba, J.-I., Shimura, H., Otagaki, S., Tsukahara, S., Matsuzawa, A., Kim, B.M., Goto, K. & Masuta, C. (2011a). Virus-mediated efficient induction of epigenetic modifications of endogenous genes with phenotypic changes in plants. *Plant Journal* 65: 156 – 168.
- Kanazawa, A., Inaba, J., Kasai, M., Shimura, H. & Masuta, C. (2011b). RNA-mediated epigenetic modifications of an endogenous gene targeted by a viral vector: a potent gene silencing system to produce a plant that does not carry a transgene but has altered traits. *Plant Signaling Behavior* 6: 1090 – 1093.
- Kasai, A. & Harada, T. (2015). Epimutant induction as a new plant breeding technology. *Japan Agricultural Research Quarterly* 49: 301 – 305.
- Kasai, M. & Kanazawa, A. (2013). Induction of RNA-directed DNA methylation and heritable transcriptional gene silencing as a tool to engineer novel traits in plants. *Plant Biotechnology* 30: 233 – 241.
- Kasai, A., Bai, S., Li, T. & Harada, T. (2011). Graft-transmitted siRNA signal from root induces visual manifestation of endogenous post transcriptional gene silencing in the scion. *PLoS ONE*: e16895.
- Kathiria, P. & Eudes, F. (2014). Nucleases for genome editing in crops. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3: 14 – 19.
- Kausch, A.P., Deresienski, A., Hague, J., Tilelli, M., Dellaporta, S.L., Nelson, K. & Li, Y. (2013). Hybrid plant systems for breeding and gene confinement in bioenergy crops. *In: Suib, S.L. (ed.), New and Future Developments in Catalysis,* Elsevier Press, Amsterdam, pp. 141 – 173.
- Keung, A.J., Joung, J.K., Khalil, A.S. & Collins, J.J. (2015). Chromatin regulation at the frontier of synthetic biology. *Nature Reviews Genetics* 16: 159 – 171.
- Kim, S. & Kim, J.S. (2011). Targeted genome engineering via zinc finger nucleases. *Plant Biotechnology Reports* 5: 9 – 17.
- Kim, H. & Kim, J.S. (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Reviews Genetics* 15: 321 – 334.
- Kim, B.O., Han, J.S., il Park, K., Jeon, S.M. & Kim, C.K. (2015a). Absence of AVP1 transcripts in wild type watermelon scions grafted onto transgenic bottle gourd rootstocks. *Journal of Plant Biotechnology* 42: 13 – 18.
- Kim, H., Kim, S.T., Kim, S.G., & Kim, J.S. (2015b). Targeted genome editing for crop improvement. *Plant Breeding and Biotechnology* 3: 283 – 290.
- King, G.J., Amoah, S. & Kurup, S. (2010). Exploring and exploiting epigenetic variation in crops. *Genome* 53: 856 – 868.
- Kishigami, R., Yamagishi, N., Ito, T. & Yoshikawa, N. (2014). Detection of apple latent spherical virus in seeds and seedlings from infected apple trees by reverse transcription quantitative PCR and deep sequencing: evidence for lack of transmission of the virus to most progeny seedlings. *Journal of General Plant Pathology* 80: 490 – 498.
- Klocko, A.L., Ma, C., Robertson, S., Esfandiari, E., Nilsson, O. & Strauss, S.H. (2015). FT overexpression induces precocious flowering and normal reproductive development in Eucalyptus. *Plant Biotechnology Journal* *in press*.

- Kochevenko, A. & Willmitzer, L. (2003). Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-based site-specific modification of the tobacco acetolactate synthase gene. *Plant Physiology* 132: 174 – 184.
- Köeferle, A., Stricker, S.H. & Beck, S. (2015). Brave new epigenomes: the dawn of epigenetic engineering. *Genome Medicine* 7: 59.
- Kokotovich, A. & Kuzma, J. (2014). Conflicting futures environmental regulation of plant targeted genetic modification. *Bulletin of Science, Technology & Society* 34: 108-120.
- Kon, T. & Yoshikawa, N. (2014). Induction and maintenance of DNA methylation in plant promoter sequences by apple latent spherical virus-induced transcriptional gene silencing. *Frontiers in Microbiology* 5: 595.
- Konagaya, K.I., Tsuda, M., Okuzaki, A., Ando, S. & Tabei, Y. (2013). Application of the acetolactate synthase gene as a cisgenic selectable marker for *Agrobacterium*-mediated transformation in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Plant Biotechnology* 30: 125 –133.
- Kost, T.D., Gessler, C., Jänsch, M., Flachowsky, H., Patocchi, A. & Broggini, G.A. (2015). Development of the first cisgenic apple with increased resistance to fire blight. *PLoS one* 10: e0143980.
- Krastanova, S.V., Balaji, V., Holden, M.R., Sekiya, M., Xue, B., Momol, E.A. & Burr, T.J. (2010). Resistance to crown gall disease in transgenic grapevine rootstocks containing truncated virE2 of *Agrobacterium*. *Transgenic Research* 19: 949 – 958.
- Krenek, P., Samajova, O., Luptovciak, I., Duskocilova, A., Komis, G., & Samaj, J. (2015). Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. *Biotechnology Advances* 33: 1024–1042.
- Krens, F.A., Schaart, J.G., van der Burgh, A.M., Tinnenbroek-Capel, I.E., Groenwold, R., Kodde, L.P., Broggini, G.A.L., Gessler, C. & Schouten, H.J. (2015). Cisgenic apple trees; development, characterization, and performance. *Frontiers in Plant Science* 6: 286.
- Kuligowska, K., Lütken, H., Hegelund, J.N. & Müller, R. (2015). Future perspectives of in vitro culture and plant breeding. *Acta Horticulturae* 1083: 27 – 34.
- Kumagai, M.H., Donson, J., della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K. & Grill, L.K. (1995). Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 1679 – 1683.
- Kumar, V. & Jain, M. (2015). The CRISPR–Cas system for plant genome editing: advances and opportunities. *Journal of Experimental Botany* 66: 47 – 57.
- La Malfa, S., Distefano, G., Domina, F., Nicolosi, E., Toscano, V. & Gentile, A. (2009). Evaluation of citrus rootstock transgenic for rolABC genes. *In: II. International Symposium on Citrus Biotechnology* 892: 131 – 140.
- Lapidot, M.M., Smirra, I., Huet, H., Peleg, D. & Lempel, O. (2014). Methods and compositions for the delivery of nucleic acids to seeds. U.S. Patent No. 20150040268 A1.
- Lawrenson, T., Shorinola, O., Stacey, N., Li, C., Ostergaard, L., Patron, N., Uauy, C. & Harwood, W. (2015). Induction of targeted, heritable mutations in barley and *Brassica oleracea* using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome Biology* 16: 1 – 13.
- Le Roux, P., Flachowsky, H., Hanke, M.-V., Gessler, C. & Patocchi, A. (2012). Use of transgenic early flowering approach in apple (*Malus x domestica* Borkh.) to introgress fire blight resistance from cultivar Evereste. *Molecular Breeding* 30: 857 – 874.
- Leckie, B.M. & Stewart, C.N. (2011). Agroinfiltration as a technique for rapid assays for evaluating candidate insect resistance transgenes in plants. *Plant Cell Reports* 30: 325 – 334.
- Lee, J., Chung, J.H., Kim, H.M., Kim, D.W. & Kim, H. (2015). Designed nucleases for targeted genome editing. *Plant Biotechnology Journal* *in press*.

- Lemgo, G. N. Y., Sabbadini, S., Pandolfini, T., & Mezzetti, B. (2013). Biosafety considerations of RNAi-mediated virus resistance in fruit-tree cultivars and in rootstock. *Transgenic Research* 22: 1073 – 1088.
- Lewis, R.S. & Kernodle, S.P. (2009). A method for accelerated trait conversion in plant breeding. *Theoretical and Applied Genetics* 118: 1499 – 1508.
- Li, T., Liu, B., Spalding, M.H., Weeks, D.P. & Yang, B. (2012). High efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nature Biotechnology* 30: 390 – 392.
- Li, J.F., Norville, J.E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J., Church, G.M. & Sheen, J. (2013). Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology* 31: 688 – 691.
- Li, Z., Liu, Z.B., Xing, A., Moon, B.P., Koellhoffer, J.P., Huang, L., Ward, T., Clifton, E., Falco, S.C. & Cigan, A. M. (2015). Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiology* 169: 960 – 970.
- Liang, Z., Zhang, K., Chen, K. & Gao, C. (2014). Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *Journal of Genetics and Genomics* 41: 63 – 68.
- Lloyd, A., Plaisier, C.L., Carroll, D. & Drews, G.N. (2005). Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 2232 – 2237.
- Lor, V. S., Starker, C.G., Voytas, D.F., Weiss, D. & Olszewski, N.E. (2014). Targeted mutagenesis of the tomato PROCERA gene using transcription activator-like effector nucleases. *Plant Physiology* 166: 1288 – 1291.
- Lowder, L.G., Zhang, D., Baltus, N.J., Paul, J.W., Tang, X., Zheng, X., Voytas, D.F., Hsieh, T.-F., Zhang, Y. & Qi, Y. (2015). A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation. *Plant Physiology* 169: 971 – 985.
- Lu, H., Viswanath, V., Ma, C., Etherington, E., Dharmawardhana, P., Shevchenko, O., Strauss, S.H., Pearce, D.W., Rood, S.B. & Busov, V. (2015). Recombinant DNA modification of gibberellin metabolism alters growth rate and biomass allocation in *Populus*. *Tree Genetics & Genomes* 11: 127.
- Luo, S., Li, J., Stoddard, T.J., Baltus, N.J., Demorest, Z.L., Clasen, B.M., Coffman, A., Retterath, A., Mathis, L. Voytas, D.F. & Zhang, F. (2015). Non-transgenic plant genome editing using purified sequence-specific nucleases. *Molecular Plant* 8: 1425 – 1427.
- Lusser, M. & Davies, H. V. (2013). Comparative regulatory approaches for groups of new plant breeding techniques. *New Biotechnology* 30: 437 – 446.
- Lusser, M., Parisi, C., Plan, D. & Rodriguez-Cerezo, E. (2011). New plant breeding techniques: State-of-the-art and prospects for commercial development. European Commission, Joint Research Centre (JRC). JRC Report, EUR 24760 EN. <http://ipts.jrc.ec.europa.eu/publications/pub.cfm?id=4100>
- Lusser, M., Parisi, C., Plan, D. & Rodriguez-Cerezo, E. (2012). Deployment of new biotechnologies in plant breeding. *Nature Biotechnology* 30: 231 – 239.
- Lütken, H., Hegelund, J.N., Himmelboe, M., Lauridsen, U.B. & Müller, R. (2015). Natural transformation in plant breeding – A biotechnological platform for quality improvement of ornamental, agricultural and medicinal plants. *Acta Horticulturae* 1087: 19 – 27.
- Ma, L., Zhu, F., Li, Z., Zhang, J., Li, X., Dong, J. & Wang, T. (2015a). TALEN-based mutagenesis of lipoxygenase LOX3 enhances the storage tolerance of rice (*Oryza sativa*) seeds. *PLoS one* 10: e0143877.
- Ma, X., Zhang, Q., Zhu, Q., Liu, W., Chen, Y., Qiu, R., Wang, B., Yang, Z., Li, H., Lin, Y., Xie, Y., Shen, R., Chen, S., Wang, Z., Chen, Y., Guo, J., Chen, L., Zhao, X., Dong, Z. & Liu, Y.G. (2015b). A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Molecular Plant* 8: 1274 – 1284.
- Mackenzie, S.A. (2011). Inquiry on regulatory status of null segregant (NS) plants derived from GE plants. www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/Mackenzie_Letter_Null_Segregants_Dec%2011.pdf.

- Mahfouz, M. & Li, L. (2011) TALE nucleases and next generation GM crops. *GM Crops* 2: 99 – 103.
- Mahfouz, M.M., Li, L., Shamimuzzaman, M., Wibowo, A., Fang, X. & Zhu, J.K. (2011). De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108: 2623 – 2628.
- Mao, Y., Zhang, H., Xu, N., Zhang, B., Gao, F. & Zhu, J.K. (2013). Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants. *Molecular Plant* 6: 2008 – 2011.
- Marimuthu, M.P.A., Jolivet, S., Ravi, M., Pereira, L., Davda, J.N., Cromer, L., Wang, L., Nogu e, F., Chan, S.W.L., Siddiqi, I. & Mercier, R. (2011). Synthetic clonal reproduction through seeds. *Science* 331: 876.
- Martin-Ortigosa, S., Peterson, D.J., Valenstein, J.S., Lin, V.S.Y., Trewyn, B.G., Lyznik, L.A. & Wang, K. (2014). Mesoporous silica nanoparticle-mediated intracellular Cre protein delivery for maize genome editing via loxP site excision. *Plant Physiology* 164: 537 – 547.
- Marton, I., Zuker, A., Shklarman, E., Zeevi, V., Tovkach, A., Roffe, S., Ovadis, M., Tzfira, T. & Vainstein, A. (2010). Nontransgenic genome modification in plant cells. *Plant Physiology* 154: 1079 – 1087.
- Matsuda, N., Ikeda, K., Kurosaka, M., Isuzugawa, K., Endo, T., Omura, M. & Takashina, T. (2006). In vitro flowering on transgenic pears (*Pyrus communis* L.) expressing CiFT, a Citrus ortholog of the Arabidopsis FT gene. Abstract Book of the 3rd Intl. Rosaceae Genomics Conf., 19-20 March, 2006, 45. ISHS, Napier, New Zealand.
- Matzke, M.A., Kanno, T., Huettel, B., Daxinger, L. & Matzke, A.J.M. (2007). Targets of RNA-directed DNA methylation. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 512 – 519.
- McGarry, R.C. & Ayre, B.G. (2012). Geminivirus-mediated delivery of florigen promotes determinate growth in aerial organs and uncouples flowering from photoperiod in cotton. *PLoS one* 7: e36746.
- McGarry, R.C. & Kragler, F. (2013). Phloem-mobile signals affecting flowers: applications for crop breeding. *Trends in Plant Science* 18: 198 – 206.
- Miao, J., Guo, D., Zhang, J., Huang, Q., Qin, G., Zhang, X., Wan, J., Gu, H. & Qu, L.J. (2013). Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Research* 23: 1233 – 1236.
- Michno, J.M., Wang, X., Liu, J., Curtin, S. J., Kono, T.J. & Stupar, R.M. (2015). CRISPR/Cas mutagenesis of soybean and *Medicago truncatula* using a new web-tool and a modified Cas9 enzyme. *GM Crops & Food in press*.
- Mikami, M., Toki, S. & Endo, M. (2015). Comparison of CRISPR/Cas9 expression constructs for efficient targeted mutagenesis in rice. *Plant Molecular Biology* 88: 561 – 572.
- Molesini, B., Pii, Y. & Pandolfini, T. (2012). Fruit improvement using intragenesis and artificial microRNA. *Trends in Biotechnology* 30: 80 – 88.
- Molnar, A., Melnyk, C.W., Bassett, A., Hardcastle, T.J., Dunn, R. & Baulcombe, D.C. (2010). Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* 328: 872 – 875.
- Morflora (2014). TraitUp-Platform – Instant trait introduction for plant protection & enhancement. www.morflora.com/userfiles/file/FinalMorfloraBrochure.pdf
- Mozes-Koch, R., Gover, O., Tanne, E., Peretz, Y., Maori, E., Chernin, L. & Sela, I. (2012). Expression of an entire bacterial operon in plants. *Plant Physiology* 158: 1883 – 1892.
- Murovec, J. & Bohanec, B. (2011). Haploids and doubled haploids in plant breeding. *In: Abdurakhmonov, I. (ed.), Plant Breeding. InTech, Rijeka, Croatia, pp. 87 – 106.*
- Nagel, A.K., Kalariya, H. & Schnabel, G. (2010). The *Gastrodia* antifungal protein (GAFP-1) and its transcripts are absent from scions of chimeric-grafted plum. *HortScience* 45: 188 – 192.
- Nakayama, T.J., Bor m, A., Chiari, L., Molinari, H.B.C. & Nepomuceno, A.L. (2014). Precision genetic engineering. *In: Bor m, A. & Fritsche-Neto, R. (eds.), Omics in Plant Breeding. John Wiley & Sons, Inc, Chichester, UK, pp. 187 – 205.*

- Nekrasov, V., Staskawicz, B., Weigel, D., Jones, J.D. & Kamoun, S. (2013). Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology* 31: 691 – 693.
- Nicolia, A., Proux-Wéra, E., Åhman, I., Onkokesung, N., Andersson, M., Andreasson, E. & Zhu, L.H. (2015). Targeted gene mutation in tetraploid potato through transient TALEN expression in protoplasts. *Journal of Biotechnology* 204: 17 – 24.
- Notaguchi, M., Abe, M., Kimura, T., Daimon, Y., Kobayashi, T., Yamaguchi, A., Tomita, Y., Dohi, K., Mori, M. & Araki, T. (2008). Long-distance, graft-transmissible action of Arabidopsis FLOWERING LOCUS T protein to promote flowering. *Plant Cell Physiology* 49: 1645 – 1658.
- NTWG (2011). Final Report. New Techniques Working Group (NTWG). http://webservices.edcc.eu/attachments/index/0890994/draftreportversion_9_final.pdf
- Oh, T.J. & May, G.D. (2001). Oligonucleotide-directed plant gene targeting. *Current Opinion in Biotechnology* 12: 169 – 172.
- Okano, Y., Miki, D. & Shimamoto, K. (2008). Small interfering RNA (siRNA) targeting of endogenous promoters induces DNA methylation, but not necessarily gene silencing, in rice. *Plant Journal* 53: 65 – 77.
- Okuzaki, A. & Toriyama, K. (2004). Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice. *Plant Cell Reports* 22: 509 – 512.
- Osakabe, Y. & Osakabe, K. (2015a). Genome editing with engineered nucleases in plants. *Plant and Cell Physiology* 56: 389 – 400.
- Osakabe, Y. & Osakabe, K. (2015b). Genome editing in higher plants. *In: Yamamoto, T. (ed.), Targeted Genome Editing Using Site-Specific Nucleases*. Springer Japan, pp. 197 – 205.
- Otagaki, S., Kasai, M., Masuta, C. & Kanazawa, A. (2013). Enhancement of RNA-directed DNA methylation of a transgene by simultaneously downregulating a ROS1 ortholog using a virus vector in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in Genetics* 4: 44.
- Palumbo, R. (2003). The potential for green fluorescent protein as a screening tool in the production of haploid potato plants. Master Thesis. Virginia Polytechnic Institute and State University. <http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-12192003-162452/>
- Park, S.M., Lee, J.S., Jegal, S., Jeon, B.Y., Jung, M., Park, Y.S., Han, S.L., Shin, Y.S., Her, N.H., Lee, J.H., Lee, M.Y., Ryu, K.H., Yang, S.G. & Harn, C.H. (2005). Transgenic watermelon rootstock resistant to CGMMV (cucumber green mottle mosaic virus) infection. *Plant Cell Reports* 24: 350 – 356.
- Pauwels, K., Podevin, N., Breyer, D., Carroll, D. & Herman, P. (2014). Engineering nucleases for gene targeting: safety and regulatory considerations. *New Biotechnology* 31: 18 – 27.
- Peer, R., Rivlin, G., Golobovitch, S., Lapidot, M., Gal-On, A., Vainstein, A., Tzfira, T. & Flaishman, M.A. (2015). Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in perennial fruit trees. *Planta* 241: 941 – 951.
- Pena, L., Martin-Trillo, M., Juarez, J., Pina, J.A., Navarro, L. & Martinez-Zapater, J.M. (2001). Constitutive expression of Arabidopsis LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. *Nature Biotechnology* 19: 263 – 267.
- Peretz, Y., Mozes-Koch, R., Akad, F., Tanne, E., Czosnek, H. & Sela, I. (2007). A universal expression/silencing vector in plants. *Plant Physiology* 145: 1251 – 1263.
- Petolino, J.F. (2015). Genome editing in plants via designed zinc finger nucleases. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 51: 1 – 8.
- Petolino, J.F., Sastry-Dent, L. & Samuel, J.P. (2015). Zinc finger nuclease-mediated gene targeting in plants. *In: Azhakanandam, K., Silverstone, A., Daniell, H. & Davey, M.R. (eds.) Recent Advancements in Gene Expression and Enabling Technologies in Crop Plants*. Springer New York, pp. 363 – 381.

- Podevin, N., Davies, H. V., Hartung, F., Nogue, F., & Casacuberta, J. M. (2013). Site-directed nucleases: a paradigm shift in predictable, knowledge-based plant breeding. *Trends in Biotechnology* 31: 375 – 383.
- Prigge, V., Xu, X., Li, L., Babu, R., Chen, S., Atlin, G.N. & Melchinger, A.E. (2012). New insights into the genetics of in vivo induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. *Genetics* 190: 781 – 793.
- Prins, T.W. & Kok, E.J. (2010). Food and feed safety aspects of cisgenic crop plant varieties. RIKILT-Institute of Food Safety Wageningen University & Research Centre. <http://edepot.wur.nl/157733>.
- Puchta, H. & Fauser, F. (2014). Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future. *The Plant Journal* 78: 727 – 741.
- Purkayastha, A. & Dasgupta, I. (2009). Virus-induced gene silencing: a versatile tool for discovery of gene functions in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 967 – 976.
- Puthigae, S., Templeton, K., Sontam, D., Whittaker, D., Bryant, C., Jones, C., Gill, G., Richardson, K. & Hanley, Z. (2010). Engineering drought tolerance in Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.) using its own genome. *In: «Plant Biology 2010», American Society of Plant Biologists, Poster 07001.* <http://abstracts.aspb.org/pb2010/public/P07/P07001.html>.
- Qi, Y. (2015). High efficient genome modification by designed zinc finger nuclease. *In: Zhang, F., Puchta, H. & Thomson, J.G. (eds.), Advances in New Technology for Targeted Modification of Plant Genomes.* Springer New York, pp. 39 – 53.
- Ravi, M. & Chan, S.W.L. (2010). Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature* 464: 615 – 618.
- Ravi, M. & Chan, S.W. (2013). Centromere-mediated generation of haploid plants. *In: Jiang, J. & Birchler, J.A. (eds.), Plant Centromere Biology.* Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, USA, pp. 169 – 181.
- Ravi, M., Marimuthu, M.P., Tan, E.H., Maheshwari, S., Henry, I.M., Marin-Rodriguez, B., Urtecho, G., Tan, J., Thornhill, K., Zhu, F., Panoli, A., Sundaresan, V., Britt, A.B., Comai, L. & Chan, S.W. (2014). A haploid genetics toolbox for *Arabidopsis thaliana*. *Nature Communications* 5: 5334.
- Rice, M.C., May, G.D., Kipp, P.B., Parekh, H. & Kmiec, E.B. (2000). Genetic repair of mutations in plant cellfree extracts directed by specific chimeric oligonucleotides. *Plant Physiology* 123: 427 – 437.
- Righetti, L., Djennane, S., Berthelot, P., Cournol, R., Wilmot, N., Loridon, K., Vergne, E. & Chevreau, E. (2014). Elimination of the nptII marker gene in transgenic apple and pear with a chemically inducible R/Rs recombinase. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 117: 335 – 348.
- Rinaldo, A.R. & Ayliffe, M. (2015). Gene targeting and editing in crop plants: a new era of precision opportunities. *Molecular Breeding* 35: 1 – 15.
- Rivera-Torres, N. & Kmiec, E.B. (2015). Genetic spell-checking: gene editing using single-stranded DNA oligonucleotides. *Plant Biotechnology Journal* *in press*.
- Robertson, D. (2004). VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. *Annual Review of Plant Biology* 55: 495 – 519.
- Rommens, C.M. (2004) All-native DNA transformation: a new approach to plant genetic engineering. *Trends in Plant Science* 9: 457 – 464.
- Rommens, C.M. (2007). Intragenic crop improvement: combining the benefits of traditional breeding and genetic engineering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4281 – 4288.
- Rommens, C.M. (2010). Barriers and paths to market for genetically engineered crops. *Plant Biotechnology Journal* 8: 101 – 111.
- Rommens, C.M., Humara, J.M., Ye, J., Yan, H., Richael, C., Zhang, L., Perry, R. & Swords, K. (2004). Crop improvement through modification of the plant's own genome. *Plant Physiology* 135: 421 – 431.

- Rommens, C.M., Bougri, O., Yan, H., Humara, J.M., Owen, J., Swords, K. & Ye, J. (2005). Plant-derived transfer DNAs. *Plant Physiology* 139: 1338 – 1349.
- Rommens, C.M., Ye, J.S., Richael, C. & Swords, K. (2006). Improving potato storage and processing characteristics through all-native DNA transformation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 9882 – 9887.
- Rommens, C.M., Haring, M.A., Swords, K., Davies, H.V. & Belknap, W.R. (2007). The intragenic approach as a new extension to traditional plant breeding. *Trends in Plant Science* 12: 397 – 403.
- Rommens, C.M., Yan, H., Swords, K., Richael, C. & Ye, J.S. (2008). Low-acrylamide French fries and potato chips. *Plant Biotechnology Journal* 6: 843 – 853.
- Rommens, C.M., Conner, A., Yan, H. & Hanley, Z. (2011). Intragenic vectors and marker-free transformation tools for a greener biotechnology. *In: Stewart, C.N., Touraev, A. Citovsky, V. & Tzfira, T. (eds.), Plant Transformation Technologies*. Wiley-Blackwell, Ames, IA, pp. 93 – 107.
- Ron, M., Kajala, K., Pauluzzi, G., Wang, D., Reynoso, M.A., Zumstein, K., Garcha, J., Winte, S., Masson, H., Inagaki, S., Federici, F., Sinha, N., Deal, R.B., Bailey-Serres, J. & Brady, S.M. (2014). Hairy root transformation using *Agrobacterium rhizogenes* as a tool for exploring cell type-specific gene expression and function using tomato as a model. *Plant Physiology* 166: 455 – 469.
- Rosellini, D. (2011). Selectable marker genes from plants: reliability and potential. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 47: 222 – 233.
- Rugini, E., Silvestri, C., Cristofori, V., Brunori, E. & Biasi, R. (2015). Ten years field trial observations of rTDNA cherry Colt rootstocks and their effect on grafted sweet cherry cv Lapins. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 123: 557 – 568.
- Ruiter, R., Van Den Brande, I., Stals, E., Delaure, S., Cornelissen, M. & D'Halluin, K. (2003). Spontaneous mutation frequency in plants obscures the effect of chimeraplasty. *Plant Molecular Biology* 53: 715 – 729.
- Ryu, C.-M., Anand, A., Kang, L. & Mysore, K.S. (2004). Agrodrench: a novel and effective agroinoculation method for virus-induced gene silencing in roots and diverse solanaceous species. *Plant Journal* 40: 322 – 331.
- Saika, H. & Toki, S. (2011). Gene targeting applied to designed-mutation breeding of high-tryptophan rice. ISB News Report December 2011. www.isb.vt.edu/news/2011/Dec/GeneTargeting.pdf.
- Saika, H., Oikawa, A., Matsuda, F., Onodera, H., Saito, K. & Toki, S. (2011). Application of gene targeting to designed mutation breeding of high-tryptophan rice. *Plant Physiology* 156: 1269 – 1277.
- Sandhu, A.P.S., Abdelnoor, R.V. & Mackenzie, S.A. (2007). Transgenic induction of mitochondrial rearrangements for cytoplasmic male sterility in crop plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 1766 – 1770.
- Santamaria, R.R., Shao, M.R., Wang, G., Nino-Liu, D.O., Kundariya, H., Wamboldt, Y., Dweikat, I. & Mackenzie, S.A. (2014). MSH1-induced non-genetic variation provides a source of phenotypic diversity in *Sorghum bicolor*. *PLoS one* 9: e108407.
- Sasaki, S., Yamagishi, N. & Yoshikawa, N. (2011). Efficient virus-induced gene silencing in apple, pear and Japanese pear using Apple latent spherical virus vectors. *Plant Methods* 7: 15.
- Sauer, N.J., Mozoruk, J., Miller, R.B., Warburg, Z.J., Walker, K.A., Beetham, P.R., Schöpke, C.R., & Gocal, G.F.W. (2015). Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing. *Plant Biotechnology Journal* *in press*.
- Schaart, J.G. (2004). Towards consumer-friendly cisgenic strawberries which are less susceptible to *Botrytis cinerea*. Ph.D. thesis, Wageningen University, Wageningen, the Netherlands. <http://edepot.wur.nl/121605>.
- Schaart J.G. & Visser, R.G.F. (2009). Novel Plant Breeding Techniques - Consequences of new genetic modification-based plant breeding techniques in comparison to conventional plant breeding. COGEM Research Report

number 2009-02. The Netherlands Commission on Genetic Modification. www.cogem.net/index.cfm/en/publications/publicatie/novel-plant-breeding-techniques.

Schaart, J.G., van de Wiel, C.C., Lotz, L.A. & Smulders, M.J. (2015). Opportunities for products of new plant breeding techniques. *Trends in Plant Science in press*.

Schaeffer, S.M. & Nakata, P.A. (2015). CRISPR/Cas9-mediated genome editing and gene replacement in plants: Transitioning from lab to field. *Plant Science* 240: 130 – 142.

Schouten, H.J., Krens, F.A. & Jacobsen, E. (2006a). Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. *EMBO Reports* 7: 750 – 753.

Schouten, H.J., Krens, F.A. & Jacobsen, E. (2006b). Do cisgenic plants warrant less stringent oversight? *Nature Biotechnology* 24: 753.

Scorza, R., Dardick, C., Raines, D., Callahan, A., Castro, S. & DeJong, T. (2014). 'Fastrack' – A revolutionary approach to long-generation cycle specialty crop breeding. *Research Reports* 2014. <http://ucanr.edu/repository/fileaccess.cfm?article=155712&p=MIAEJB&CFID=104180251&CFTOKEN=52802055>

Segui-Simarro, J.M., Corral-Martínez, P., Parra-Vega, V. & González-García, B. (2011). Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Reports* 30: 765 – 778.

Sela, I., Peretz, Y. & Mozes-Koch, R. (2014). Plant expression constructs comprising and uses thereof. U.S. Patent No. 8,722,966.

Senthil-Kumar, M. & Mysore, K.S. (2011a). Virus-induced gene silencing can persist for more than 2 years and also be transmitted to progeny seedlings in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *Plant Biotechnology Journal* 9: 797 – 806.

Senthil-Kumar, M. & Mysore, K.S. (2011b). New dimensions for VIGS in plant functional genomics. *Trends in Plant Science* 16: 656 – 665.

Shan, Q., Wang, Y., Chen, K., Liang, Z., Li, J., Zhang, Y., Zhang, K., Liu, J., Voytas, D.F., Zheng, X., Zhang, Y. & Gao, C. (2013a). Rapid and efficient gene modification in rice and *Brachypodium* using TALENs. *Molecular Plant* 6: 1365 – 1368.

Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., Zhang, K., Liu, J., Xi, J.J., Qiu, J.L. & Gao, C. (2013b). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology* 31: 686 – 688.

Shan, Q., Zhang, Y., Chen, K., Zhang, K. & Gao, C. (2015). Creation of fragrant rice by targeted knockout of the *OsBADH2* gene using TALEN technology. *Plant Biotechnology Journal* 13: 791 – 800.

Shenoy, V. & Sarma, N. P. (2012). New facets of 21st century plant breeding. *Journal of Rice Research* 5(1).

Shibukawa, T., Yazawa, K., Kikuchi, A. & Kamada, H. (2009). Possible involvement of DNA methylation on expression regulation of carrot *LEC1* gene in its 5'-upstream region. *Gene* 437: 22 – 31.

Shibuya, K., Fukushima, S. & Takatsuji, H. (2009). RNA-directed DNA methylation induces transcriptional activation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106: 1660 – 1665.

Shukla, V.K., Doyon, Y., Miller, J.C., DeKever, R.C., Moehle, E.A., Worden, S.E., Mitchell, J.C., Arnold, N.L., Gopalan, S., Meng, X., Choi, V.M., Rock, J.M., Wu, Y.-Y., Katibah, G.E., Zhifang, G., McCaskill, D., Simpson, M.A., Blakeslee, B., Greenwalt, S.A., Butler, H.J., Hinkley, S.J., Zhang, L., Rebar, E.J., Gregory, P.D. & Urnov, F.D. (2009). Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* 459: 437 – 441.

Sijen, T., Vijn, I., Rebocho, A., van Blokland, R., Roelofs, D., Mol, J.N. & Kooter, J.M. (2001) Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Current Biology* 11: 436 – 440.

Smolka, A., Li, X.Y., Heikelt, C., Welander, M. & Zhu, L.-H. (2010). Effects of transgenic rootstocks on growth and development of non-transgenic scion cultivars in apple. *Transgenic Research* 19: 933 – 948.

- Song, G.Q., Sink, K.C., Walworth, A.E., Cook, M.A., Allison, R.F. & Lang, G.A. (2013). Engineering cherry rootstocks with resistance to *Prunus* necrotic ring spot virus through RNAi-mediated silencing. *Plant Biotechnology Journal* 11: 702 – 708.
- Song, G.Q., Walworth, A.E. & Loescher, W.H. (2015). Grafting of genetically engineered plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 140: 203 – 213.
- Sprink, T., Metje, J. & Hartung, F. (2015). Plant genome editing by novel tools: TALEN and other sequence specific nucleases. *Current Opinion in Biotechnology* 32: 47 – 53.
- Srinivasan, C., Dardick, C., Callahan, A. & Scorza, R. (2012). Plum (*Prunus domestica*) trees transformed with Poplar FT1 result in altered architecture, dormancy requirement, and continuous flowering. *PLoS ONE* 7: e40715.
- Stegemann, S., Keuthe, M., Greiner, S. & Bock, R. (2012). Horizontal transfer of chloroplast genomes between plant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 2434 – 2438.
- Stower, H. (2012). Breeding vigour backwards. *Nature Reviews Genetics* 13: 300.
- Stratmann, J.W. & Hind S.R. (2011). Gene silencing goes viral - and uncovers the private life of plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 140: 91 – 102.
- Sun, Z., Li, N., Huang, G., Xu, J., Pan, Y., Wang, Z., Tang, Q., Song, M. & Wang, X. (2013). Site-specific gene targeting using transcription activator-like effector (TALE)-based nuclease in *Brassica oleracea*. *Journal of Integrative Plant Biology* 55: 1092 – 1103.
- Sun, X., Hu, Z., Chen, R., Jiang, Q., Song, G., Zhang, H. & Xi, Y. (2015). Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system. *Scientific Reports* 5: 10342.
- Svitashev, S., Young, J., Schwartz, C., Gao, H., Falco, S.C. & Cigan, A.M. (2015). Targeted mutagenesis, precise gene editing and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant Physiology* 169: 931 – 945.
- Tam, S.M., Hays, J.B. & Chetelat, R.T. (2011). Effects of suppressing the DNA mismatch repair system on homeologous recombination in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 123: 1445 – 1458.
- Tanaka, J. (2010). Transgenic male sterility permits efficient recurrent selection in autogamous crops. *Crop Science* 50: 1124 – 1127.
- Tek, A.L., Stupar, R.M. & Nagaki, K. (2015). Modification of centromere structure: a promising approach for haploid line production in plant breeding. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 39: 557 – 562.
- Thyssen, G., Svab, Z. & Maliga, P. (2012). Cell-to-cell movement of plastids in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 2439 – 2443.
- Tilelli, M., Nelson, K., Deresienski, A., Hague, J. & Kausch, A. (2012). Use of a selectable marker for in situ embryo rescue using transgenic switchgrass for recovery of wide crosses. *Plant Biology 2012, Annual Meetings of the American Society of Plant Biologists, July 20-24, Austin, TX, USA.*
- Tränkner, C., Lehmann, S., Hoenicka, H., Hanke, M.-V., Fladung, M., Lenhardt, D., Dunemann, F., Gau, A., Schlangen, K., Lamnoy, M. & Flachowsky, H. (2010). Over-expression of an FT-homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants. *Planta* 232: 1309 – 1324.
- Transgen (2015). USA: Erneut Gentechnik-Kartoffel zugelassen. www.transgen.de/337.usa-gentechnik-kartoffel-zugelassen.html
- Tzfira, T., Weinthal, T., Marton, I., Zeevi, V., Zuker, A. & Vainstein, A. (2012). Genome modifications in plant cells by custom-made restriction enzymes. *Plant Biotechnology Journal* 10: 373 – 389.
- Ülker, B., Li, Y., Rosso, M.G., Logemann, E., Somssich, I.E. & Weissbar B. (2008). T-DNA-mediated transfer of *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal DNA into plants. *Nature Biotechnology* 26: 1015 – 1017.

- Upadhyay, S.K., Kumar, J., Alok, A. & Tuli, R. (2013). RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat. *G3: Genes| Genomes| Genetics* 3: 2233 – 2238.
- USDA (2011). Pioneer Hi-Bred International, Inc. Seed Production Technology (SPT) Process DP-32138-1 Corn. Final Environmental Assessment. United States Department of Agriculture (USDA). www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/08_33801p_fea.pdf.
- Vainstein, A., Marton, I., Zuker, A., Danziger, M. & Tzfira T. (2011). Permanent genome modifications in plant cells by transient viral vectors. *Trends in Biotechnology* 29: 363 – 369.
- Vanblaere, T., Szankowski, I., Schaart, J., Schouten, H., Flachowsky, H., Broggin, G.A.L. & Gessler, C. (2011). The development of a cisgenic apple plant. *Journal of Biotechnology* 154: 304 – 311.
- Vanblaere, T., Flachowsky, H., Gessler, C. & Broggin, G.A. (2014). Molecular characterization of cisgenic lines of apple 'Gala' carrying the Rvi6 scab resistance gene. *Plant Biotechnology Journal* 12: 2 – 9.
- Van Marcke, I. & Angenon, G. (2013). Genomic stability in Nicotiana plants upon silencing of the mismatch repair gene MSH2. *Plant Biotechnology Reports* 7: 467 – 480.
- Van Nocker, S. & Gardiner, S.E. (2014). Breeding better cultivars, faster: applications of new technologies for the rapid deployment of superior horticultural tree crops. *Horticulture Research* 1: 14022.
- Vahdati, K., McKenna, J.R., Dandekar, A.M., Leslie, C.A., Uratsu, S.L., Hackett, W.P., Negri, P. & McGranahan, G.H. (2002). Rooting and other characteristics of a transgenic walnut hybrid (*Juglans hindsii* x *J. regia*) rootstock expressing rolABC. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127: 724 – 728.
- Vigne, E., Komar, V. & Fuchs, M. (2004). Field safety assessment of recombination in transgenic grapevines expressing the coat protein gene of grapevine fanleaf virus. *Transgenic Research* 13: 165 – 179.
- Virdi, K.S., Laurie, J.D., Xu, Y.-Z., Yu, J.-T., Shao, M.-R., Sanchez, R., Feng, S.-H., Zhai, J.-X., Kundariya, H., Wang, D., Wamboldt, Y., Riethoven J.-J.M., Arrieta-Montiel, M.P., Shedge, V. & Mackenzie, S.A. (2015). Arabidopsis MSH1 mutation alters the epigenome and produces heritable changes in plant growth. *Nature Communications* 6: 6386.
- Vleeshouwers, V., Rietman, H., Krenek, P., Champouret, N., Young, C., Oh, S.K., Wang, M.Q., Bouwmeester, K., Vosman, B., Visser, R.G.F., Jacobsen, E., Govers, F., Kamoun, S. & Van der Vossen, E.A.G. (2008). Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of Potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes. *Plos One* 3: e2875.
- Vogel, B. (2012). Neue Pflanzenzuchtverfahren. Grundlagen für die Klärung offener Fragen bei der rechtlichen Regulierung neuer Pflanzenzuchtverfahren. Im Auftrag des Bundesamts für Umwelt (BAFU). www.bafu.admin.ch/biotechnologie/01760/08936/index.html?lang=de&download=NHZLpZeg7t,Inp6I0NTU042I2Z6In1acy4Zn4Z2qZpnO2YUq2Z6gpJCHdnt_hGym162epYbg2c_JjKbNoKSn6A--
- Voytas, D.F. (2013). Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annual Review of Plant Biology* 64: 327 – 350.
- Voytas, D.F. & Gao, C. (2014). Precision genome engineering and agriculture: opportunities and regulatory challenges 12: e1001877.
- Waltz, E. (2012). Tiptoeing around transgenics. *Nature Biotechnology* 30: 215 – 217.
- Waltz, E. (2015). USDA approves next-generation GM potato. *Nature Biotechnology* 33: 12 – 13.
- Wang, Q.C. & Valkonen, J.P.T. (2008). Elimination of two viruses which interact synergistically from sweet potato by shoot tip culture and cryotherapy. *Journal of Virological Methods* 154: 135 – 145.
- Wang, Q.C. & Valkonen, J.P.T. (2009). Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. *Trends in Plant Science* 14: 119 – 122.
- Wang, M.B. & Waterhouse, P.M. (2001). Application of gene silencing in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 146 – 150.

- Wang, Q., Cuellar, W.J., Rajamäki, M.-L., Hirata, Y. & Valkonen, J.P.T. (2008). Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. *Molecular Plant Pathology* 9: 237 – 250.
- Wang, L., Yang, M., Akinagbe, A., Liang, H., Wang, J. & Ewald, D. (2012). *Bacillus thuringiensis* protein transfer between rootstock and scion of grafted poplar. *Plant Biology* 14: 745 – 750.
- Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C. & Qiu, J.L. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology* 32: 947 – 951.
- Wang, M., Liu, Y., Zhang, C., Liu, J., Liu, X., Wang, L., Wang, W., Chen, H., Wie, C., Ye, X., Li, X. & Tu, J. (2015a). Gene editing by co-transformation of TALEN and chimeric RNA/DNA oligonucleotides on the rice OsEPSPS gene and the inheritance of mutations. *PLoS ONE* 10: e0122755.
- Wang, S., Zhang, S., Wang, W., Xiong, X., Meng, F. & Cui, X. (2015b). Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system. *Plant Cell Reports* 34: 1473 – 1476.
- Wani, S.H., Sah, S.K., Sági, L. & Solymosi, K. (2015). Transplastomic plants for innovations in agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 35: 1391 – 1430.
- Wassenegger, M., Krczal, G. & Dalakouras, A. (2010). Method for the production of a transgene-free plant with altered methylation pattern. European Patent Application EP 2 198 700 A1. European Patent Office.
- Weeks, J.T., Ye, J. & Rommens, C.M. (2008). Development of an in planta method for transformation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Research* 17: 587 – 597.
- Weeks, D.P., Spalding, M.H. & Yang, B. (2015). Use of designer nucleases for targeted gene and genome editing in plants. *Plant Biotechnology Journal in press*.
- Weigel, D. & Nilsson, O. (1995). A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* 377: 495 – 500.
- Weigl, K., Wenzel, S., Flachowsky, H., Peil, A. & Hanke, M.V. (2015). Integration of BpMADS4 on various linkage groups improves the utilization of the rapid cycle breeding system in apple. *Plant Biotechnology Journal* 13: 246 – 258.
- Wendt, T., Holm, P.B., Starker, C.G., Christian, M., Voytas, D.F., Brinch-Pedersen, H. & Holme, I.B. (2013). TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants. *Plant Molecular Biology* 83: 279-285.
- Wenzel, S., Flachowsky, H. & Hanke, M.V. (2013). The Fast-track breeding approach can be improved by heat-induced expression of the FLOWERING LOCUS T genes from poplar (*Populus trichocarpa*) in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 115: 127 – 137.
- Whitford, R., Fleury, D., Reif, J.C., Garcia, M., Okada, T., Korzun, V. & Langridge, P. (2013). Hybrid breeding in wheat: technologies to improve hybrid wheat seed production. *Journal of Experimental Botany* 64: 5411 – 5428.
- Wijnker, E. & de Jong, H. (2008). Managing meiotic recombination in plant breeding. *Trends in Plant Science* 13: 640 – 646.
- Wijnker, E., van Dun, K., de Snoo, C.B., Lelivelt, C.L., Keurentjes, J.J., Naharudin, N.S., Ravi, M., Chan, S.W., de Jong, H. & Dirks, R. (2012). Reverse breeding in *Arabidopsis* generates homozygous parental lines from a heterozygous plant. *Nature Genetics* 44 : 467 – 470.
- Wolt, J.D., Wang, K. & Yang, B. (2015). The regulatory status of genome-edited crops. *Plant Biotechnology in press*.

- Woo, J.W., Kim, J., Kwon, S.I., Corvalán, C., Cho, S.W., Kim, H., Kim, S.-G., Kim, S.-T., Choe, S. & Kim, J.S. (2015). DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nature Biotechnology* 33: 1162 – 1164.
- Wright, D.A., Townsend, J.A., Winfrey, R.J., Jr., Irwin, P.A., Rajagopal, J., Lonosky, P.M., Hall, B.D., Jondle, M.D. & Voytas, D.F. (2005). High-frequency homologous recombination in plants mediated by zincfinger nucleases. *Plant Journal* 44: 693 – 705.
- Wu, Y., Fox, T.W., Trimnell, M.R., Wang, L., Xu, R.J., Cigan, A.M., Huffman, G.A., Garnaat, C.W. & Albertsen, M.C. (2015). Development of a novel recessive genetic male sterility system for hybrid seed production in maize and other cross-pollinating crops. *Plant Biotechnology Journal* *in press*.
- Würdig, J., Flachowsky, H., Saß, A., Peil, A. & Hanke, M.V. (2015). Improving resistance of different apple cultivars using the Rvi6 scab resistance gene in a cisgenic approach based on the Flp/FRT recombinase system. *Molecular Breeding* 35: 1 – 18.
- Xie, K. & Yang, Y. (2013). RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Molecular Plant* 6: 1975 – 1983.
- Xie, K., Minkenberg, B. & Yang, Y. (2015). Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 3570 – 3575.
- Xing, H.L., Dong, L., Wang, Z.P., Zhang, H.Y., Han, C.Y., Liu, B., Wang, X.C. & Chen, Q.J. (2014a). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology* 14: 327.
- Xing, W., Wang, Z., Wang, X., Bao, M. & Ning, G. (2014b). Over-expression of an FT homolog from *Prunus mume* reduces juvenile phase and induces early flowering in rugosa rose. *Scientia Horticulturae* 172: 68 – 72.
- Xiong, J.S., Ding, J. & Li, Y. (2015). Genome-editing technologies and their potential application in horticultural crop breeding. *Horticulture Research* 2: 15019.
- Xu, J., Wang, Y.Z., Xia Yin, H. & Jing Liu, X. (2009). Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Malus zumi* (Matsumura) Rehd using leaf explant regeneration system. *Electronic Journal of Biotechnology* 12: 3 – 4.
- Xu, J., Li, M., Chen, L., Wu, G., & Li, H. (2012a). Rapid generation of rice mutants via the dominant negative suppression of the mismatch repair protein OsPMS1. *Theoretical and Applied Genetics* 125: 975 – 986.
- Xu, Y.Z., De la Rosa Santamaria, R., Viridi, K.S., Arrieta-Montiel, M.P., Razvi, F., Li, S., Ren, G., Yu, B., Alexander, D., Guo, L., Feng, X., Dweikat, I.M., Clemente, T.E. & Mackenzie, S.A. (2012b). The chloroplast triggers developmental reprogramming when MUTS HOMOLOG1 is suppressed in plants. *Plant Physiology* 159: 710 – 720.
- Xu, R., Li, H., Qin, R., Wang, L., Li, L., Wei, P. & Yang, J. (2014). Gene targeting using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas system in rice. *Rice* 7: 5.
- Xu, R.F., Li, H., Qin, R. Y., Li, J., Qiu, C.H., Yang, Y.C., Ma, H., Li, L., Wie, P.C. & Yang, J. B. (2015). Generation of inheritable and «transgene clean» targeted genome-modified rice in later generations using the CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports* 5: 11491.
- Yamagishi, N. & Yoshikawa, N. (2011a). Virus-induced gene silencing of endogenous genes and promotion of flowering in soybean by Apple latent spherical virus-based vectors. *In: Sudaric, A. (ed.), Soybean – Molecular Aspects of Breeding*, InTech Publishers, pp. 43 – 56.
- Yamagishi, N. & Yoshikawa, N. (2011b). Expression of FLOWERING LOCUS from *Arabidopsis thaliana* induces precocious flowering in soybean irrespective of maturity group and stem growth habit. *Planta* 233: 561 – 568.
- Yamagishi, N., Sasaki, S., Yamagata, K., Komori, S., Nagase, M., Wada, M., Yamamoto, T. & Yoshikawa, N. (2011). Promotion of flowering and reduction of a generation time in apple seedlings by ectopical expression of

the Arabidopsis thaliana FT gene by using the Apple latent spherical virus vector. *Plant Molecular Biology* 75: 193 – 204.

Yamagishi, N., Kishigami, R. & Yoshikawa, N. (2014). Reduced generation time of apple seedlings to within a year by means of a plant virus vector: a new plant-breeding technique with no transmission of genetic modification to the next generation. *Plant Biotechnology Journal* 12: 60 –68.

Yang, X., Kundariya, H., Xu, Y.Z., Sandhu, A.P., Yu, J., Hutton, S.F., Zhang, M. & Mackenzie, S. A. (2015). MSH1-derived epigenetic breeding potential in tomato. *Plant Physiology* 168: 222 – 232.

Youk, E.S., Pack, I.S., Kim, Y.J., Yoon, W.K., Kim, C.G., Ryu, S.B., Harn, C.H., Jeong, S.C. & Kim, H.M. (2009). A framework for molecular genetic assessment of a transgenic watermelon rootstock line. *Plant Science* 176: 805 – 811.

Yu, W. & Birchler, J.A. (2015). A maize RWS-GFP haploid inducer line. *In: Program and Abstracts of the 57th Annual Maize Genetics Conference, St. Charles, Illinois, p. 85. www.maizegdb.org/maize_meeting/abstracts/2015Program.pdf.*

Zenna, N.S., Cruz, F.C.S., Javier, E.L., Duka, I.A., Barrion, A.A. & Azzam, O. (2006). Genetic analysis of tolerance to rice tungro bacilliform virus in rice (*Oryza sativa* L.) through agroinoculation. *Journal of Phytopathology* 154: 197 – 203.

Zhang, C. & Hsieh, T.F. (2013). Heritable epigenetic variation and its potential applications for crop improvement. *Plant Breeding and Biotechnology* 1: 307 – 319.

Zhang, H., Harry, D.E., Ma, C., Yuceer, C., Hsu, C.-Y. Vikram, V., Shevchenko, O., Etherington, E. & Strauss, S.H. (2010). Precocious flowering in trees: the FLOWERING LOCUS T gene as a research and breeding tool in *Populus*. *Journal of Experimental Botany* 61: 2549 – 2560.

Zhang, Y., Zhang, F., Li, X., Baller, J.A., Qi, Y., Starker, C.G., Bogdanove, A.J. & Voytas, D.F. (2013). Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. *Plant Physiology* 161: 20 – 27.

Zhang, H., Zhang, J., Wei, P., Zhang, B., Gou, F., Feng, Z., Mao, Y., Yang, L., Zhang, H., Xu, N. & Zhu, J.K. (2014). The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnology Journal* 12: 797 – 807.

Zhang, H., Gou, F., Zhang, J., Liu, W., Li, Q., Mao, Y., Botella, J.R. & Zhu, J.K. (2016). TALEN-mediated targeted mutagenesis produces a large variety of heritable mutations in rice. *Plant Biotechnology Journal* 14: 186 – 194.

Zhao, D. & Song, G.Q. (2014). Rootstock-to-scion transfer of transgene-derived small interfering RNAs and their effect on virus resistance in nontransgenic sweet cherry. *Plant Biotechnology Journal* 12: 1319 – 1328.

Zhu, T., Peterson, D.J., Tagliani, L., St Clair, G., Baszczyński, C.L. & Bowen, B. (1999). Targeted manipulation of maize genes in vivo using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 8768 – 8773.

Zhu, T., Mettenburg, K., Peterson, D.J., Tagliani, L. & Baszczyński, C.L. (2000). Engineering herbicide-resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nature Biotechnology* 18: 555 – 558.

Zhu, L., Holfors, A., Ahlman, A., Xue, Z. & Welander, M. (2001). Transformation of the apple rootstock M.9/29 with the rolB gene and its influence on rooting and growth. *Plant Science* 160: 433 – 439.

Zhu, L.H., Li, X.Y. & Welander, M. (2009). Can Arabidopsis AP1 gene shorten the juvenility of apple? *Acta Horticulturae* 829: 259 – 264.

Zhu, R., Shevchenko, O., Ma, C., Maury, S., Freitag, M. & Strauss, S.H. (2013). Poplars with a PtDDM1-RNAi transgene have reduced DNA methylation and show aberrant post-dormancy morphology. *Planta* 237: 1483 – 1493.

